



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**KOMPLEMENTÁRNÍ ANALÝZA PROKARYOTICKÝCH  
BUNĚK POMOCÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE A  
RAMANOVY SPEKTROSKOPIE**

COMPLEMENTARY ANALYSIS OF PROCARYOTIC CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY AND RAMAN SPECTROSCOPY

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Terézia Ikrényiová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Dr. Kamila Hrubanová**

**BRNO 2021**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1550/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Terézia Ikrényiová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Dr. Kamila Hrubanová**

### Název diplomové práce:

Komplementární analýza prokaryotických buněk pomocí elektronové mikroskopie a Ramanovy spektroskopie

### Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na zadané téma
2. Kultivace vybraných prokaryotických buněk a jejich analýza konvenčními metodami
3. Visualizace buněčných struktur pomocí elektronové mikroskopie
4. Analýza chemického fingerprintu buněk pomocí Ramanovy spektroskopie

### Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Terézia Ikrényiová  
student(ka)

Dr. Kamila Hrubanová  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## Abstrakt

Diplomová práca sa zaoberá v teoretickej časti konvenčnými metódami analýzy bakteriálnych buniek, polyhydroxyalkanoátmi, Ramanovou spektroskopiou a elektrónovou mikroskopiou. V experimentálnej časti práce je opísaná produkcia polyhydroxybutyrátu vybranými termofilnými baktériami a ich analýza pomocou plynovej chromatografie, kryogénnej skenovacej elektrónovej mikroskopie a Ramanovej spektroskopie. Vybraná vzorka bola analyzovaná aj na transmisnom elektrónovom mikroskope. Porovnaním výsledkov dosiahnutých použitím vyššie spomenutých metód bolo zistené, že najväčší obsah PHB akumulovala baktéria *Schlegelella thermodepolymerans*. Najmenšie množstvo PHB bolo dosiahnuté u baktérie *Rubrobacter xylanophilus*. Analýzou kryo-SEM fotografií vzoriek baktérií bol potvrdený predpoklad, že u PHB granúl dochádza k plastickej deformácii ihlicovitého tvaru, ktorá vzniká pri mrazovom lámaní vzorky. Taktiež bolo zistené, že charakterizácia bakteriálnych buniek vyvodená z mikroskopického pozorovania vzoriek sa zhodovala s ich popisom uvedeným v literatúre. TEM poskytla fotografie s lepším rozlíšením na ktorých boli bunky a PHB podstatne viditeľnejšie. Práca sa zaoberá aj analýzou chemického fingerpruntu buniek pomocou Ramanovej spektroskopie. Z nameraných Ramanových spektier pre jednotlivé vzorky bolo identifikovaných niekoľko biomolekúl.

## Abstract

This master thesis deals with conventional methods of bacterial cell analysis, polyhydroxyalkanoates, Raman spectroscopy and electron microscopy in the theoretical part. The production of polyhydroxybutyrate by selected thermophilic bacteria and their analysis by gas chromatography, cryogenic scanning electron microscopy and Raman spectroscopy is described in the experimental part. The chosen sample was analyzed by a transmission electron microscope. Comparing the results from previous mentioned methods it was found that the bacteria *Schlegelella thermodepolymerans* accumulated the highest amount of PHB. The lowest amount of PHB was obtained by bacteria *Rubrobacter xylanophilus*. The assumption that the PHB granules formed so-called needle-like plastic deformations during freeze-fracturing was affirmed by cryo-SEM photos analysis. Moreover, it was found that the bacterial cell characterization deduced from microscopic observation of samples corresponded to the description in the literature. TEM provided better resolution photos and in consequence the cells and PHB are more visible. The thesis is also focused on chemical fingerprint analysis of cells by Raman spectroscopy. Several biomolecules were identified by measured Raman spectra for the particular samples.

## Kľúčové slová

Ramanova spektroskopia, elektrónová mikroskopia, kryo-SEM, TEM, polyhydroxyalkanoáty, termofilné baktérie

## Key words

Raman spectroscopy, electron microscopy, cryo-SEM, TEM, polyhydroxyalkanoates, thermophilic bacteria

IKRÉNYIOVÁ, Terézia. *Komplementární analýza prokaryotických buněk pomocí elektronové mikroskopie a Ramanovy spektroskopie*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131529>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Kamila Hrubanová.

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že som všetky použité zdroje správne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Podpis študentky

## **Pod'akovanie:**

Chcela by som sa poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Kamile Hrubanovej, Ph.D. za všetky rady a pripomienky k písaniu nielen teoretickej časti práce, ale najmä za vedenie celej experimentálnej časti. Veľká vďaka patrí taktiež Ing. Kateřine Mrázovej za koordináciu mojej práce v laboratóriu a pomoc pri spracovaní výsledkov experimentov. Ďakujem taktiež ostatným konzultantom doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D., Mgr. Martinovi Kizovskému, Ing. Eve Slaninovej ktorí mi pri mojej práci pomáhali. Moje poďakovanie patrí aj Ing. Jane Nebesářovej, CSc. z Biologického centra Akademie věd za realizáciu TEM fotografií vybraných vzoriek. Na záver chcem poďakovať Ústavu přístrojové techniky Akademie věd a Ing. Vladislavovi Krzyžánkovi, Ph.D. za možnosť realizovať veľkú časť tejto práce na tomto ústave.

## Obsah

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
2.1	Prokaryotické mikroorganizmy .....	9
2.2	Konvenčné metódy analýzy bakteriálnych buniek .....	10
2.2.1	Cytometrické metódy .....	10
2.2.2	Fluorescenčná mikroskopia .....	10
2.2.3	Konfokálna mikroskopia .....	10
2.2.4	Konvenčné metódy stanovenia PHA v baktériách .....	11
2.3	PHA produkované mikroorganizmami .....	11
2.3.1	Polyhydroxyalkanoáty .....	11
2.3.2	Termofilné baktérie produkujúce PHA .....	15
2.4	Ramanova spektroskopia .....	17
2.4.1	Ramanova spektroskopia laserovej pinzety .....	19
2.4.2	Analýza bakteriálnych buniek pomocou Ramanovej spektroskopie .....	20
2.5	Elektrónová mikroskopia .....	20
2.5.1	Skenovacia elektrónová mikroskopia .....	21
2.5.2	Transmisná elektrónová mikroskopia .....	27
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	30
3.1	Použité chemikálie, prístroje, mikroorganizmy .....	30
3.1.1	Použité chemikálie .....	30
3.1.2	Použité prístroje .....	31
3.1.3	Použité mikroorganizmy .....	31
3.2	Kultivácia mikroorganizmov .....	32
3.2.1	Kultivácia bakteriálnych inokúl .....	32
3.2.2	Kultivácia baktérií v minerálnom produkčnom médiu .....	32
3.3	Stanovenie obsahu biomasy .....	34
3.3.1	Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy .....	34
3.3.2	Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy .....	34
3.4	Stanovenie obsahu PHA v biomase a jej koncentrácie .....	34
3.4.1	Príprava štandardov pre kalibračnú závislosť .....	35
3.4.2	Príprava vzoriek na ich analýzu plynovou chromatografiou .....	35

3.5	Analýza vzoriek pomocou mikroskopických techník .....	35
3.5.1	Vysokotlakové mrazenie vzoriek .....	35
3.5.2	Analýza vzoriek pomocou kryo-SEM .....	35
3.5.3	Príprava vzoriek na analýzu pomocou TEM .....	38
3.6	Analýza vzoriek pomocou Ramanovej mikrospektroskopie .....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	42
4.1	Spektrofotometrické stanovenie optickej hustoty.....	42
4.2	Analýza vzoriek pomocou plynovej chromatografie.....	42
4.3	Analýza vzoriek pomocou kryo-SEM .....	44
4.3.1	Mikroskopovanie vzoriek bez pokovovania .....	44
4.3.2	Mikroskopovanie vzoriek po pokovovaní platinou .....	48
4.3.3	Mikroskopovanie vzoriek po nadmernej sublimácii v mikroskope.....	50
4.4	Analýza vzoriek pomocou TEM.....	50
4.5	Analýza vzoriek pomocou Ramanovej mikrospektroskopie .....	51
5	Záver .....	57
6	Zoznam použitej literatúry .....	59
7	Zoznam použitých skratiek .....	64
8	Prílohy .....	65
8.1	Kalibrácia metódy pre stanovenie PHB pomocou plynovej chromatografie .....	65

# 1 ÚVOD

Identifikácia a izolácia mikroorganizmov je dôležitá nielen vo výskumnej oblasti, ale je nevyhnutná aj pre zabezpečenie sterilného prostredia pri výrobe potravinárskych výrobkov a farmaceutických produktov, v medicínskom prostredí a v neposlednom rade pri kontrole pitnej vody, ktorá je základom života. Klasické postupy zahrňujúce kultiváciu a následnú identifikáciu mikroorganizmu podľa morfológických a metabolických znakov sú zdĺhavé. Analytické techniky nám umožňujú kvalitatívnu a/alebo kvantitatívnu analýzu vzoriek. Niektoré z konvenčných metód na analýzu prokaryotických buniek (polymerázová reťazová reakcia - PCR) alebo ich produktov (plynová chromatografia) sú však náročné na uskutočnenie a čas, prípadne sa vyznačujú inými nevýhodami (vysoká cena, deštrukcia vzorky). Prokaryotické bunky môžeme pozorovať aj pomocou mikroskopu. Klasická svetelná mikroskopia však neumožňuje pozorovať všetky štruktúry buniek kvôli nedostatočnému zväčšeniu a malému rozlíšeniu.

Ramanova spektroskopia predstavuje ekonomicky výhodnejšiu metódu vhodnú ku kvalitatívnej, kvantitatívnej analýze vzoriek, ale aj na monitorovanie biotechnologického procesu. Vyznačuje sa potrebou malého objemu vzorky na analýzu, robustnosťou, citlivosťou, ale aj neinvazívnosťou. Rýchla a šetrná analýza vzoriek pomocou tejto techniky umožňuje jej široké uplatnenie vo viacerých odvetviach priemyslu, ale najmä v biochémii a v biomedicíne. Použitím tejto metódy môžu byť v bunkách baktérií identifikované intracelulárne produkty ako sú PHA (polyhydroxyalkanoáty). Producentami týchto prírodných polyesterov môžu byť aj termofilné baktérie. Tieto extrémofily sú schopné prežiť pri náročných podmienkach prostredia (vysoká teplota, extrémne hodnoty pH, chemické činidlá), čo je výhodné pre celkový proces produkcie (zníženie nákladov, nižšia kontaminácia inými mikroorganizmami). PHA môžu byť vhodnými náhradami konvenčných plastov, a taktiež vďaka ich biodegradabilite sú šetrné k ekosystému. Nájdú si uplatnenie v potravinárstve, kozmetike, medicíne, ale sú využiteľné aj v každodennom živote, pretože syntetických plastov sa denne vyrobí, použije, ale bohužiaľ aj vyhodí a zlikviduje veľké množstvo.

Analýza PHA v bakteriálnych bunkách môže byť realizovaná aj pomocou kryogénnej skenovacej elektrónovej mikroskopie (kryo-SEM). Tento typ mikroskopie využíva fyzikálne metódy úpravy biologických vzoriek a umožní nám získavať informácie z povrchu zmrazených vzoriek. Zmrazením sa zachová hydratácia a taktiež sa preparát spevní, preto je vhodná na pozorovanie aj tenkých rezov buniek. Táto technika je jediná, ktorá zabezpečí vizualizáciu trojfázového zloženia materiálu. Pozorujeme pomocou nej prirodzené vlastnosti vzorky bez ovplyvnenia chemických činidiel používaných pri chemickej úprave vzorky pred mikroskopovaním alebo pri iných metódach vhodných k pozorovaniu biologického materiálu. Skenovací elektrónový mikroskop sa vyznačuje pri porovnaní s klasickým svetelným mikroskopom lepším rozlíšením, niekoľkonásobne väčším zväčšením. Posúva teda možnosti pozorovania až k mikroskopickým komplexom, ktoré sa nachádzajú vnútri buniek. Pomocou SEM (skenovacia elektrónová mikroskopia) je možné určiť prvkové zloženie vzorky, ale aj kvantifikovať jednotlivé zložky. Výhodou oproti transmisnej elektrónovej mikroskopii je možnosť skúmania hrubších vzoriek, ale aj využitie špeciálnych detektorov, ktoré dokážu rozlíšiť signály podávajúce informáciu o chemickom zložení a topografii vzorky. Pomocou

TEM (transmisná elektrónová mikroskopia) však dostávame informácie aj o vnútorných detailoch vzorky, a taktiež má tento typ mikroskopie lepšie rozlíšenie ako SEM.

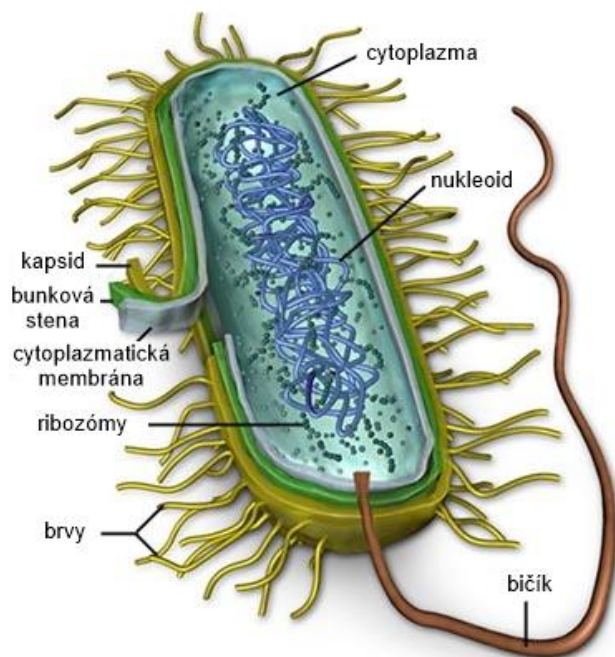
Všetky tri metódy analýzy prokaryotických buniek a ich produktov sa neustále rozvíjajú a ich začlenenie do procesu produkcie a kvantifikácie PHA môže znížiť náklady na výrobu týchto biodegradovateľných polymérov. Taktiež sú vhodné k identifikácii nových mikroorganizmov akumulujúcich PHA, čo zabezpečí produkciu rozmanitejšieho spektra týchto bioplastov.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Prokaryotické mikroorganizmy

Bunka je jedinečná súčasť všetkých živých systémov. Je ich najmenšou časťou a definujeme ju ako ich základnú a funkčnú jednotku. Mikroorganizmy sa klasifikujú podľa fyziológie, ale aj podľa morfológie. Z morfologického hľadiska sem zaraďujeme prokaryotické mikroorganizmy, ktoré sú podstatne menej rozšírenou skupinou ako tiež sem prislúchajúce eukaryotické mikroorganizmy. Jednoduchšiu štruktúru buniek má práve vývojovo staršia prokaryota [1]. Stavba prokaryotickej bunky je ilustrovaná na obr. 1. Baktérie (ale aj sinice, prípadne aktinomycey) patria vďaka absencii pravého jadra a samostatných membránových organel (majú len cytoplazmatickú membránu) k prokaryotickým mikroorganizmom [1,2]. Podľa zdroja prijímaného uhlíka rozdeľujeme mikroorganizmy na autotrofné (zdrojom uhlíka sú anorganické látky –  $\text{CO}_2$ ) a heterotrofné (zdrojom uhlíka sú organické látky). Ďalšia klasifikácia mikroorganizmov je podľa zdroja z ktorého prijímajú energiu. Pre fototrofné organizmy je zdrojom energie slnečné žiarenie. Chemotrofné organizmy využívajú organické alebo anorganické látky, ktorých premenou získavajú energiu. Najčastejšie využívaním zdrojom uhlíka (prípadne aj energie) sú sacharidy. Väčšina mikroorganizmov ich dokáže štiepiť až na monosacharidy, ktoré sú transformované na glukózu a ďalej využívané. Práve baktérie sú schopné využívať zdroje uhlíka a získavať energiu všetkými známymi možnosťami. Keďže sú aj veľmi rozmanité po fyziologickej a biochemickej stránke, budú v tejto práci analyzovaní príslušníci bakteriálnych kmeňov [1].



Obr. 1 Stavba prokaryotickej bunky (upravené) [2]

## **2.2 Konvenčné metódy analýzy bakteriálnych buniek**

Aby sme získali informácie o bunkách baktérií, musíme ich analyzovať s využitím metódy na to určenej. Analytické techniky nám umožňujú kvalitatívnu a/alebo kvantitatívnu analýzu vzoriek. Zo sekvenačných techník je možné na detekciu baktérií využiť techniky PCR (polymerázová reťazová reakcia), ktorá však kvôli zopár nevýhodám (ako sú rušenia PCR reakcie určitými látkami obsiahnutými vo vzorke alebo citlivosť na experimentálne podmienky) dostáva do popredia analytickú techniku Ramanovu spektroskopiu [3]. Práve táto analytická metóda patrí medzi vybrané metodológie k realizácii experimentálnej činnosti tejto práce. Viac bude Ramanova spektroskopia opísaná v kapitole 2.4.

### **2.2.1 Cytometrické metódy**

Možnosť detekcie bakteriálnych buniek (prípadne aj počítanie) nám umožňuje aj prietoková cytometria. Dokážeme pomocou nej stanoviť vlastnosti a určiť funkcie buniek. Avšak pri viacerých cytometrických metódach sa ku získaniu biochemickej informácie o bunke využíva exogénne fluorescenčné značenie. Ich používanie môže viesť k pozmeneniu chemického zloženia a ovplyvňovanie funkcie buniek. Metóda označovania buniek je taktiež časovo náročná a pri vzorkách, ktoré musia byť rýchlo spracované, dochádza k strate buniek odumieraním. Problémom fluorescenčného označovania je taktiež zoslabnutie fluorescenčného signálu a preto dlhodobé štúdie tej istej bunky sú náročné. Takto označované bunky sú nevhodné pre klinické štúdie (napr. nemôžu byť kvôli bezpečnosti použité pre transplantáciu u ľudí). Identifikáciu molekúl v bunkách, ale bez použitia značenia umožňuje autofluorescencia, ktorej však bunky musia byť schopné [4].

### **2.2.2 Fluorescenčná mikroskopia**

Fluorescencia molekúl sa využíva aj pri použití fluorescenčnej mikroskopii. Molekuly ktoré chceme detekovať musia fluoreskovať, takže sa častokrát nevyhneme označovaniu molekúl pomocou fluorescenčných sond. Pri zvolení rôznych sond na označenie molekúl však môžeme sledovať naraz niekoľko rôznych štruktúr v bunke. Zobrazené fluoreskujúce štruktúry sa na tmavom/čiernom pozadí javia ako veľmi kontrastné. Nevýhodou je nutnosť využitia silného excitačného zdroja (potrebné vytvoriť dostatočne veľkú intenzitu, aby bola emisia detekovateľná). Ďalším problémom je aj rozpad fluorescenčných molekúl počas excitačného stavu (photobleaching), ku ktorému dochádza prerušením väzbových interakcií v dôsledku energie dopadajúcich fotónov pred emisiou. Niektoré bunky sú po ožiarení schopné fluorescence bez použitia fluorescenčného označovania, ako bolo spomínané v predchádzajúcom odstavci. Nešpecifická autofluorescencia je však problémom pri vizualizácii buniek pomocou tejto mikroskopie. Po ožiarení vzorky svetlom určitej vlnovej dĺžky vzniká emitované svetlo nedefinovanej intenzity, a preto môže byť fluorescencia príliš slabá alebo naopak silná [5].

### **2.2.3 Konfokálna mikroskopia**

Konfokálna mikroskopia je taktiež jedným z typov svetelnej mikroskopie. Od klasickej svetelnej mikroskopie sa odlišuje tým, že sa svetlo vyžarované zo vzorky fokusuje pomocou cloniek. Dokážeme tak vymedziť časť vzorky, ktorú chceme skúmať. Neumožní nám len

vizualizáciu vnútra buniek, ale aj zaznamenávanie obrazu jednotlivých optických rezov v bunke. To nám umožní vytváranie trojrozmerného obrazu. Pomocou nej dokážeme sledovať aj bunkové reakcie v čase. Opäť je nutné využitie fluorescenčného značenia, ak vzorka nedokáže autofloreskovať. Výhodou je aj vysoko kvalitný obraz pri použití menej silného zdroja žiarenia. Medzi limitácie patrí neschopnosť rozlíšiť objekty menšie ako 0,1  $\mu\text{m}$ . Taktiež ak nemáme fixované bunky, ich pohyb môže skresľovať výsledný obraz (znížiť senzitivitu) [6]. Lepšie zväčšenie a rozlišovaciu schopnosť poskytuje ale elektrónová mikroskopia. Výhody skenovacej elektrónovej mikroskopie, ale aj jej modifikácia využitím zmrazenia vzoriek (kryo-SEM) sú popísané v kapitole 2.5 a následných podkapitolách. Práve kryo-SEM bola ďalšou zvolenou metódou k analýze bakteriálnych buniek v experimentálnej časti tejto práce.

#### **2.2.4 Konvenčné metódy stanovenia PHA v baktériách**

Medzi intracelulárne produkty baktérií patria aj polyhydroxyalkanoáty [7]. Tieto prírodné polyesterové začali v posledných rokoch konkurovať konvenčným plastom [8]. Práve preto sa neustále hľadajú možnosti, ako navýšiť ich vyprodukované množstvo v bunkách mikroorganizmov, ale aj ako čo najrýchlejšie a najpresnejšie stanoviť ich obsah. Spôsob tvorby PHA v bunkách mikroorganizmov a jednotlivé kmene baktérií umožňujúce ich akumuláciu budú priblížené v kapitole 2.3.

Problémom je však okrem ceny substrátov zdĺhavý proces stanovenia PHA v bakteriálnych bunkách. Príprava vzorky na kvantitatívnu analýzu plynovou chromatografiou je náročná na čas a manuálnu prácu. Táto metóda je tiež ekologicky nepriaznivá vďaka používaniu veľkého množstva organických chemikálií. Ďalšie metódy stanovenia PHA ako gravimetria a turbidimetria (prípadne elektrónová mikroskopia) nie sú dostatočne citlivé a spoľahlivé, aby mohli byť použité pre kontrolu výrobného procesu PHA [8]. Elektrónová mikroskopia však dokáže zobrazíť povrchovú vrstvu PHA granúl. V posledných rokoch sa diskutuje o jej presnej molekulárnej kompozícii [7]. Z tohto dôvodu bola na skúmanie PHA vybraná okrem Ramanovej spektroskopie aj elektrónová mikroskopia (konkrétne kryo-SEM). Odlíšenie baktérií produkujúcich PHA od tých, ktoré PHA neprodukujú je možné aj pomocou genetických metód, ako je PCR (nevýhody spomínané vyššie v kapitole 2.2), Southern Blot hybridizácie alebo FISH (fluorescenčne značená *in situ* hybridizácia) [9]. Výhodou spomenutej Ramanovej spektroskopie je oproti konvenčným metódam stanovenia PHA ich kvantifikácia počas biotechnologického procesu. Predstavuje to časovú úsporu, a taktiež cenená je neinvazívnosť tejto techniky [8].

### **2.3 PHA produkované mikroorganizmami**

#### **2.3.1 Polyhydroxyalkanoáty**

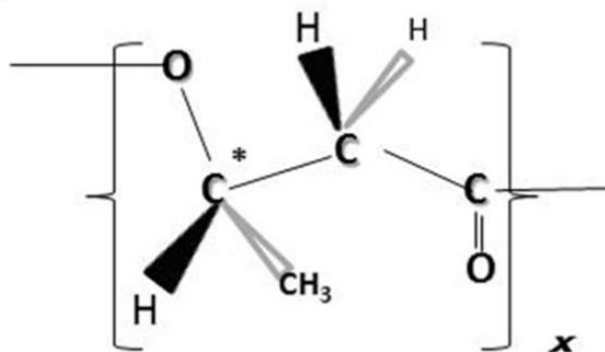
Polyhydroxyalkanoáty sú biodegradovateľné a biokompatibilné polyméry, ktoré nie možné chemicky pripraviť. K ich tvorbe dochádza len *in vivo*. Vytvárajú skupinu látok s rozličnými materiálovými vlastnosťami, ktoré závisia na monomére/och z ktorého/ých sa skladajú [8,10]. Môžu tak konkurovať konvenčným plastovým materiálom. Avšak ich materiálové vlastnosti sú stále v niektorých smeroch nedostatočné. Teploty topenia sa len približujú termoplastom

(sú nižšie), a preto sú menej odolnejšie pri vysokom zahrievaní. Teplota rozkladu polyhydroxybutyrátu sa približuje k teplote jeho topenia, čo predstavuje ďalší problém. PHB dosahuje aj podstatne menšieho predĺženia (5 %) ako napríklad polypropylén (400 %). Taktiež sa po čase stáva krehký. Riešením je použitie kopolymérov (inkorporácia 3-hydroxyvalerátu do polyméru), ktoré majú tieto vlastnosti pozitívnejšie, a preto sú využiteľnejšie v priemysle [11]. Nevýhodou je aj celková cena ich produkcie (od využitých substrátov pri kultiváciách až po ich izoláciu). Riešením je použitie odpadných produktov (napr. z poľnohospodárstva, potravinárstva) ako uhlíkatý substrát pre mikroorganizmy [8]. Pri kultivácii boli použité ako zdroj uhlíka napríklad: srvátka, lignocelulóзовé materiály, odpad zo zemiakov, vedľajšie produkty pri výrobe vína. Napriek niektorým nevýhodám sú produkované PHA aj priemyselne a biopolyméry sú ako hotový produkt značné ochrannou známkou. Medzi najväčších producentov patrí USA nasledovaná Čínou [9].

### **2.3.1.1 Akumulácia PHA v bunkách mikroorganizmov a ich následná izolácia**

Základným predpokladom, že je mikroorganizmus schopný produkcie PHA je prítomnosť enzýmu PHA-syntáza, ktorých existuje viacero typov. Táto polymeráza je kódovaná génom *phaC*. Zloženie monomérov vo výslednom PHA je podmienené PHA-syntázou, ktorou organizmus disponuje a prekursorom hydroxyacyl-CoA thioesteru, ktoré sú enzýmu dodávané. Vytvorený prekursor závisí na metabolických dráhach prebiehajúcich v bunke a na druhu použitého externého uhlíkového zdroja [10].

Baktérie sú schopné produkcie prevažne poly(3-hydroxybutyrátu) v závislosti na substráte použitom pri kultivácii. Jeho štruktúra je ilustrovaná na obr. 2, kde x značí stupeň polymerizácie (počet monomérnych jednotiek z ktorých sa skladá). PHB sa akumuluje vnútri buniek baktérií vo forme granúl. Predstavuje tak rezervný zdroj (uhlíka a/alebo energie) pre bakteriálne bunky. Pri rozpade PHB dochádza k tvorbe 3-hydroxybutyrátu a acetoacetátu (alebo jeho derivátov). V oxidačnom metabolizme dochádza k premene acetoacetátu na uhlíkové medziprodukty a k produkcii energie. Takže sa zabráni autolýze buniek alebo ich odumieraniu v prípade nepriaznivých podmienok. V experimente bolo zistené, že je pri využití acetoacetátu, ako zdroja energie a uhlíka, je nutné použiť aj iný zdroj uhlíka, ale 3HB môže byť využité samostatne bez ďalších uhlíkových zdrojov. K tvorbe PHB dochádza ak má bunka nadbytok uhlíkového zdroja (napr. glukóza, acetát). Niektoré výskumy preukázali, že bunky vyžadujú aj limitnú koncentráciu esenciálnych prvkov (napr. dusík). Neplatí to však pre všetky bakteriálne kmene. Z hľadiska rozpustnosti vo vode je v nej PHB prakticky nerozpustný [12].



Obr. 2 Štruktúrny vzorec PHB ( $x$  = stupeň polymerácie) [9]

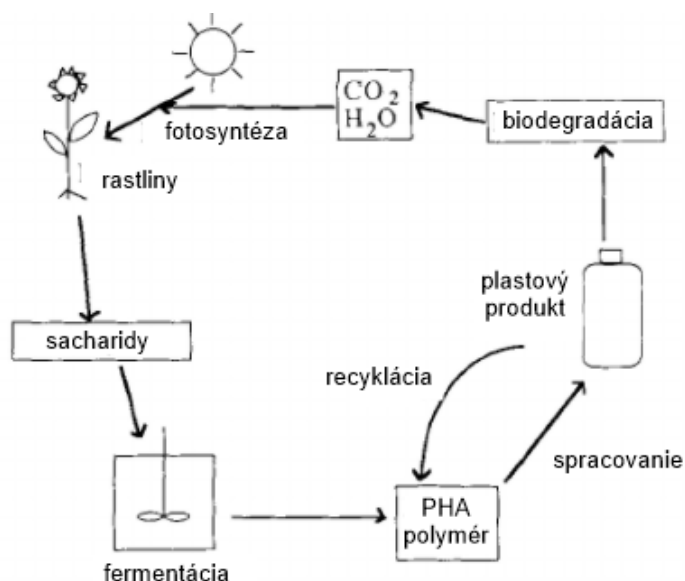
Prvý objavený mikroorganizmus schopný produkcie PHA bol bakteriálny kmeň *Bacillus megaterium*, objavený Lemoignom. Počas kultivácie tejto baktérie využívali rôzne substráty s cieľom vyprodukovať PHB [12]. Skupinou baktérií akumulujúcich PHA sú aj termofilné baktérie, ktorú sú bližšie opísané v kapitole 2.3.2. Niektoré kmene boli vybrané na realizáciu experimentálnej časti.

Produkcia PHA pomocou mikroorganizmov sa delí na upstream a downstream časť. Pred samotnou kultiváciou mikroorganizmov, patriacou do upstream procesu, je nutné vybrať vhodný produkčný kmeň, médium (kultivačné, produkčné) a jeho zložky, druh procesného módu kultivácie (kontinuálny, prítokový, vsádkový). Všetky tieto faktory vplyvajú na výslednú ekonomiku celého procesu. Ovpływujú nielen množstvo vyprodukovaného PHA, ale aj jeho čistotu. Ekonomicky výhodná je recyklácia počas fermentácie, využitie odpadných látok ako substráty alebo extrémofilné kmene, ktoré zabezpečia nižšie nároky na sterilitu počas procesu [9]. Izoláciu PHA ovplyvňuje vonkajšia vrstva obklopujúca granule PHA. Nie je známa jej presná štruktúra (ako bolo spomínané v kapitole 2.1.1.1), ale proteíny, ktoré obsahuje predstavujú problém pri downstream procese [4]. Downstream proces zahŕňa separáciu buniek konvenčnými spôsobmi (ako je centrifugácia, filtrácia) a ich rozrušenie, aby mohli byť PHA izolované. Dôležité je zvolenie vhodnej metódy k získaniu PHA. Najčastejšie je používaná extrakcia pomocou rozpúšťadiel, ktoré sú často toxické. Aj pri ich recyklácii sa táto metóda izolácie PHA stáva nielen ekologicky nepriaznivou, ale aj ekonomicky nevýhodnou. Alternatívnou voľbou môže byť vodná enzymatická digescia, diferenciálna digescia bunkových častí neobsahujúcich PHA, alebo použitie génu fága, ktorý spôsobí lýzu buniek. Tieto metódy majú však tiež svoje nevýhody (napr. degradácia PHA v prípade diferenciálnej digescie – redukcia molekulovej hmotnosti PHB až o 50 %) [9,11].

### 2.3.1.2 Biodegradácia PHA v prírode

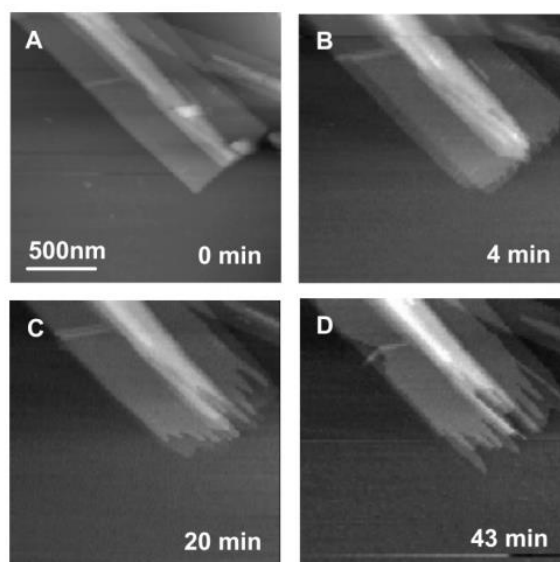
Odbúravanie PHA plastových produktov z prostredia je zabezpečené pomocou biodegradácie vid' obr. 3. Viaceré baktérie a huby vylučujú extracelulárnu PHA-depolymerázu, ktorá umožní rozklad týchto biopolymérov na vo vode rozpustné monoméry alebo oligoméry. Konečným produktom reakcie je voda a  $\text{CO}_2$ , ktorý je následne využitý v procese fotosyntézy. Získavame tak sacharidy, ktoré slúžia ako uhlíkový substrát pre kultiváciu mikroorganizmov (napr. za

účelom produkcie PHA). Po izolácii PHA z bakteriálnych buniek a vyrobení bioplastového výrobku sme opäť na začiatku procesu biodegradácie.



Obr. 3 Kolobeh PHA plastu v prírode - jeho biodegradácia (upravené) [11]

Na rýchlosť rozkladu PHA vplyvajú viaceré faktory ako sú vlastnosti PHA plastu, druh mikroorganizmu zvoleného k depolymerácii, teplota pri ktorej reakcia prebieha [11]. Na obr. 4 je ilustrovaná degradácia PHB v čase pomocou PHB-depolymerázy baktérie *R. pickettii* T1. Z kryštálov PHB sa počas enzymatickej degradácie tvorili vlákna. Bolo zistené, že hrúbka týchto vlákien v oblasti ich konca (na špičke) je menšia ako pred procesom degradácie, čo je viditeľné aj z uvedenej fotografie realizovanej pomocou Real-time AFM (mikroskopia atomárnych síl v čase) [13]. PHA-depolymeráza bola objavená aj u baktérie *Schlegelella thermodepolymerans*. Vďaka tejto skutočnosti bolo experimentálne zistené, že táto baktéria je schopná PHA nielen rozkladať, ale aj produkovať [14]. Patrí medzi zvolené produkčné mikroorganizmy využité v tejto práci k produkcii PHA. Detailnejšie opísaná je v kapitole 2.3.2.1.



Obr. 4 Enzymatická degradácia PHB v čase pomocou PHB-depolymerázy z *R. pickettii* T1 pri 37 °C, fotografia z Real-time AFM (mikroskopia atomárnych síl v čase) [13]

### 2.3.2 Termofilné baktérie produkujúce PHA

Extrémofilné baktérie sú špecifické tým, že sú schopné prežiť náročné podmienky prostredia. Vyznačujú sa väčšou robustnosťou, nižšou náchylnosťou na kontamináciu a stabilitou pri zmene podmienok dynamického rastu, čo je výhodné pri ich kultivácii. Znížia sa tak náklady na celý biotechnologický proces (napr. nie je potrebná tak dôsledná sterilita pri procese), ktorý môže byť aj jednoduchšie automatizovaný. Extrémofily predstavujú organizmy, ktoré sú vhodné k použitiu v priemyselnej biotechnológii ďalšej generácia. Zaraďujeme sem skupiny baktérií odolné voči vysokým (alkalofily) či nízkym (acidofily) hodnotám pH, vysokým koncentráciám solí (halofily), ale aj baktérie schopné rásť pri nízkych teplotách (psychrofily). Niektoré baktérie patriace tiež medzi extrémofily sú schopné využívať nezvyčajný substrát (metanotropy - metán) alebo rásť v prítomnosti toxických látok (xerofily - etanol, ťažké kovy) [15].

Medzi extrémofilné baktérie patria aj baktérie, ktoré znášajú extrémne teploty. Pri nízkych teplotách rastú psychofilné baktérie. V práci sú používané však termofilné baktérie, ktoré dokážu rásť pri vyšších teplotách. Majú relatívne malý genóm a preto patria medzi prvé organizmy, ktoré boli sekvenované. Štúdium ich vlastností umožnilo ich používanie pre biotechnologické procesy. Vyznačujú sa rezistenciou k chemickým denaturačným činidlám, nevodným rozpúšťadlám. Dokážu tolerovať aj veľmi nízke alebo vysoké pH. Ich termoenzymy majú vďaka možnosti využiť vyššie reakčné teploty široké uplatnenie v priemyselných aplikáciách, potravinárstve a farmácii. Zamedzí sa tak kontaminácii počas technologických procesov a iných operácií. Požiadavky na sterilizáciu procesu (zariadenia, použitého materiálu, pracovníkov) ale aj jeho chladenie sa znížia [15]. Využitie semi-kontinuálneho alebo kontinuálneho módu procesu bude preto dobre fungujúce. Vyprodukované metabolické teplo a energia uvoľnená počas miešania v bioreaktore môže byť použitá na jeho vyhrievanie. Ekonomickú úsporu docielime tiež ak využijeme na chladenie zariadenia okolitý vzduch (zníži

sa potreba energie a vody na chladiaci proces) [14]. Schopnosť produkcie PHA pomocou termofilov bolo zaznamenané len pre niektoré bakteriálne kmene. V kapitolách 2.3.2.1 až 2.3.2.4 budú priblížené termofilné baktérie, ktoré boli v tejto práci vybraté pre produkciu PHA.

#### **2.3.2.1 Bakteriálny rod *Schlegelella***

Elbanna (a ostatní) v roku 2003 predstavili vo svojej práci rod *Schlegelella*, ktorý patrí do podskupiny *Betaproteobaktérii* s názvom *Rubrivivax*. Baktérie patriace k tomuto rodu sú gram-negatívne, nesporulujúce, tyčinkovité a optimálne rastú pri teplote 50 °C a neutrálnom pH [16].

K tomuto rodu zaraďujeme aj *Schlegelella thermodepolymerans*, Podľa reklasifikácie od Lütke-Eversloha (a ostatných) v roku 2004 bol názov *Caenibacterium thermophilum*, ktorý bol pôvodne určený pre nezávisle izolovanú baktériu, určený synonymom pre *S. thermodepolymerans* [17]. Izolácia baktérie *S. thermodepolymerans* bola vykonaná z aktivovaného kalu pochádzajúceho z oblasti Fayoum (Egypt). Vďaka jej schopnosti degradovať PHA obsahujúce oxo- a thioesterové skupiny (čo neumožňovali dovtedy žiadne mikroorganizmy) bola ďalej skúmaná. [14,17] Bolo zistené, že dokáže utilizovať glukonát, laktát, 3HB, poly(3HB), valerát, kyselinu dehydroabietovú, ale nie napríklad xylózu [16]. To, že disponuje extracelulárnou PHA depolymerázou bolo podnetom skúmania jej schopnosti aj PHA produkovať. Kouřilová (a ostatní) uviedli vo svojej práci, že dosiahli najväčší obsah poly(3HB) pri použití xylózy, ako substrátu pre bakteriálne bunky. Týmto vyvrátili vyššie uvedené tvrdenie a dokázali, že *S. thermodepolymerans* dokáže utilizovať aj tento uhlíkatý zdroj. S využitím rôznych substrátov sa im podarilo pripraviť aj kopolyméry PHA. Optimálnu teplotu pre kultiváciu stanovili na 55 °C [14].

Ďalšou baktériou patriacou k tomuto rodu je *Schlegelella aquatica* izolovaná z horúcich prameňov v Guanizingling lokalizovaného na území Tainan na juhu Taiwanu. Táto baktéria dokáže asimilovať glukózu, maltózu, fenylacerát, glukonát a adipát. [17].

#### **2.3.2.2 Bakteriálny rod *Rubrobacter***

Nie všetky kmene rodu *Rubrobacter* boli izolované z prostredia s vysokou teplotou. Zaraďujeme sem nielen termofilné baktérie, ale aj mezofilné [18]. Kmene vybrané v tejto práci sú však schopné rásť iba za extrémne vysokých teplôt.

*Rubrobacter xylanophilus* bol objavený v termálne znečistenom odtoku, ktorý pochádzal z továrne na koberce situovanej v oblasti Wilton, Wiltshire (Spojené kráľovstvo). Z mikroskopického pozorovania bol viditeľný tyčinkovitý tvar baktérií, ale pri použití starších kultúr boli niektoré bunky aj sférického tvaru. Bolo zistené, že táto gram-pozitívna baktéria dokáže hydrolyzovať xylan, želatínu a iné komplexnejšie látky. Pre rast dokáže využívať cukry, organické kyseliny a aminokyseliny. Optimálne podmienky pre kultiváciu sú teplota 60°C a pH v rozmedzí 7,5 – 8 [19].

*Rubrobacter spartanus* bol izolovaný z pôdy odobratej z kotlovitého kráteru sopky Kilauea nachádzajúcej sa v Havajskom sopečnom národnom parku. Patrí medzi gram-pozitívne baktérie s tvarom nepravidelných tyčiniek. Zistená optimálna teplota pre rast je 50 °C a pH v rozmedzí 7,5 – 9,5. Pre rast nedokáže využiť fruktózu, mannitol alebo pyruvát. Utilizuje ale cukornaté substráty ako sú: maltóza, laktóza, glukóza, galaktóza, arabinóza (D aj L formu),



xylóza, sacharóza, manóza, celobióza. Dokáže využiť aj aminokyselinu prolín, glycerol alebo malát [18].

### **2.3.2.3 Baktéria *Tepidimonas taiwanensis***

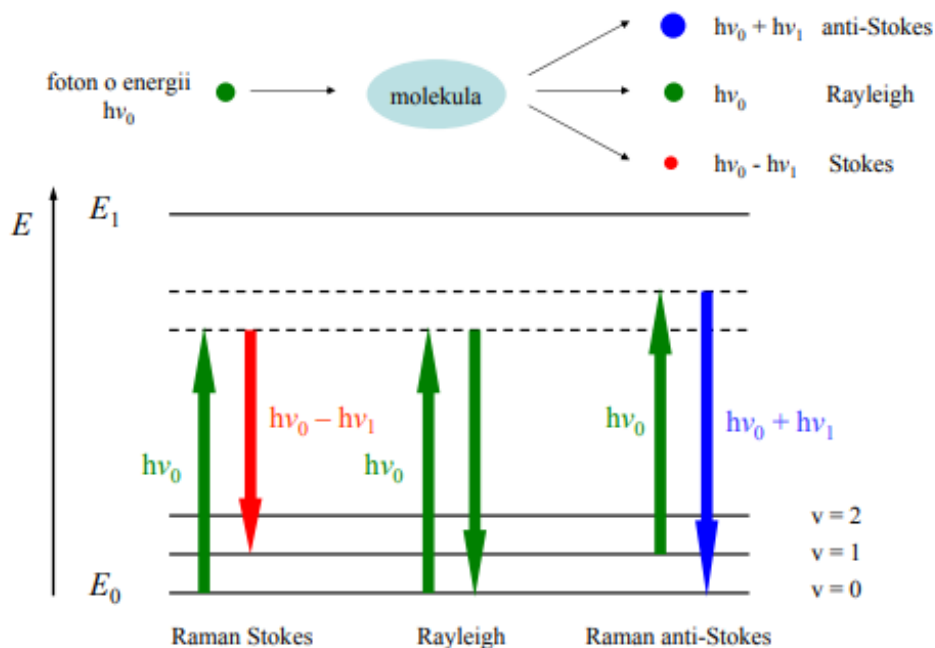
Do rodu *Tepidimonas* zaraďujeme aj gram-negatívnu, nesporulujúcu, tyčinkovitú baktériu *Tepidomonas taiwanensis*. Prvá izolácia bola uskutočnená z horúcich prameňov Sih-Chong-Si lokalizovaných v oblasti Pintung na juhu Taiwanu. Pozorovaním pod svetelným mikroskopom boli objavené v bunkách granule poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu, čo dokazuje schopnosť tejto baktérie produkovať PHA. Boli stanovené optimálne podmienky pre rast: teplota 55 °C, neutrálna pH. Baktéria je schopná utilizovať glukózu a malát, ale nevie využívať arabinózu, manózu, maltózu, manitol, glukonát, kaprát, adipát, fenylacerát, *N*-acetyl-D-glukozamín [20].

### **2.3.2.4 Baktéria *Thermomonas hydrothermalis***

Nový bakteriálny kmeň rodu *Thermomonas* bol izolovaný z horúcich prameňov Sao Gemil (Stredné Portugalsko) a dostal pomenovanie *Thermomonas hydrothermalis*. Táto gram-negatívna baktéria sa vyznačuje tyčinkovitým tvarom. Je schopná asimilovať glukózu, maltózu, furanózu, celobiózu, acetát, pyruvát, glutamovú kyselinu, ale aj aminokyseliny ako sú: lysín, prolín, glutamín, glutamát. Optimálna teplota stanovená pre rast je okolo 50 °C a pH od 4,5 do 9,5 [21].

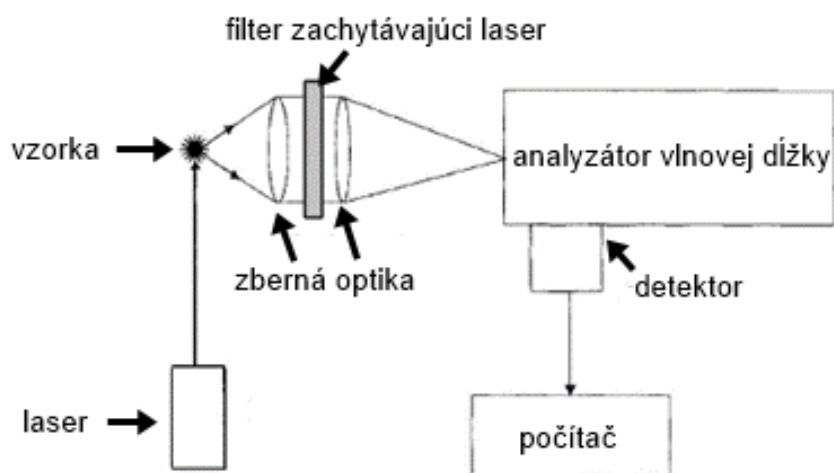
## **2.4 Ramanova spektroskopia**

Ramanova spektroskopia patrí medzi vibračné techniky a používa sa na chemickú charakterizáciu kvapalných a pevných látok [22]. Táto analytická metóda je založená na neelastickom rozptyle svetla, ku ktorému dochádza, keď svetlo interaguje so vzorkou (dochádza k výmene energie medzi žiarením a molekulou látky). Transferovaná energia odpovedá špecifickým vibráciám molekúl. Molekula je vo vibračnom excitovanom stave, keď dochádza rozptylu fotónov [23,24]. Fotón tak môže získať energiu. Ak má rozptýlené žiarenie vyššie vlnové číslo, kratšiu vlnovú dĺžku ako  $\nu_0$ , tak to vedie k anti-Stokesovmu rozptylu. Pri Stokesovom rozptyle má rozptýlené žiarenie naopak nižší vlnový počet (dlhšiu vlnovú dĺžku) ako  $\nu_0$ . Rayleighov rozptyl nesúvisí s Ramanovou spektroskopiou (rozptýlené žiarenie má nezmenený vlnový počet  $\nu_0$  (viď obr. 5) [25].



Obr. 5 Interakcia fotónu s molekulou vzorky, Rayleighov rozptyl a Ramanove rozptyly [25]

Hlavné časti Ramanovho spektrometera sú laser, cela so vzorkou zberná optika, analyzátor vlnovej dĺžky (napr. monochromátor), detektor (napr. fotonásobič), počítač (viď obr. 6). Laser predstavuje zdroj excitačného žiarenia. Zvýšenie jeho intenzity je limitované dostupnosťou lasera a radiačným poškodením vzorky. Ramanov signál prislúchajúci analytickej hodnote závisí na tom, ako dobre spektrometer zbiera a detekuje svetlo zo špecifickej intenzity vzorky. Intenzita tohto signálu je úmerná polarizovateľnosti molekuly pri odpovedajúcej vibrácii väzby/väzieb. Pre polárne väzby dostaneme slabšie signály, pre nepolárne (a obzvlášť nepolárne násobné) silnejšie. Ramanove spektrum vyjadruje závislosť intenzity rozptylu na Ramanovom posune od charakteristickej svetelnej energie  $h\nu_0$  [24,25]. Pomocou týchto spektier dokážeme určiť molekulárnu kompozíciu vzorky (nukleové kyseliny, lipidy, proteíny, sacharidy) s vysokou špecifickosťou [23]. Získanie výhodného spektra závisí častejšie na redukcii šumu a pozadia než na generovaní vhodného signálu. Šum je generovaný z detektora, lasera a pozadie je tvorené rozpúšťadlom, fluorescenciou, priamym svetlom [24].



Obr. 6 Generický, 90° iluminačný Ramanov spektrometer (upravené) [24]

Ramanova spektroskopia má kvôli mnohým výhodám široké uplatnenie nielen v medicíne, poľnohospodárstve, ale aj pri analýze potravín alebo vo výskumnej oblasti. Intenzita peaku je lineárne úmerná molekulárnej koncentrácii, a preto môže byť Ramanova spektroskopia použitá nielen na kvalitatívnu, ale aj na kvantitatívnu analýzu [4]. Ramanova spektroskopia je výhodná aj pre monitorovanie biotechnologického procesu, pretože pomocou nej dokážeme detekovať kyslíkové anióny (nitráty, fosfáty), ktorých detekčné limity sú veľmi nízke. Kvôli zanedbaniu Ramanových pásov vo vode je táto metóda vhodná najmä pre vzorky, kde je použité rozpúšťadlo voda. Výhodou je, že vzorky pre analýzu nie je potrebné upravovať [22]. Dokázané bolo aj to, že Ramanova spektroskopia môže byť využitá na rozlíšenie buniek rastúcich za anaeróbnych a aeróbnych podmienok (indikáciu rôznych metabolických dráh) vďaka detekcii kyslíka [26].

Spojenie tejto analytickej metódy býva najčastejšie so svetelnou mikroskopiou. Kombinácia konfokálneho mikroskopu s Ramanovou spektroskopiou umožní identifikáciu jednotlivých živých alebo fixovaných buniek a podáva informáciu o metabolickom stave bunky. Známe sú výskumy, kedy bola využitá na rozlíšenie rakovinových buniek od zdravých podľa analýzy Ramanovho spektra vzorky. Zo vzorky sa využíva iba malé množstvo, čo zamedzuje plytvaniu biologickým materiálom. Ďalšími výhodami je nedeštruktívnosť a nekontaktnosť tejto metódy [4,27]. Príkladom konfokálneho Ramanovho mikroskopu je aj BioRam® [27].

#### 2.4.1 Ramanova spektroskopia laserovej pinzety

Ramanova spektroskopia laserovej pinzety (LTRS) umožňuje analýzu jednotlivých buniek bez toho, aby boli imobilizované na substrát (teda analýza v suspenzii je možná). Ramanova pinzeta dokáže priestorovo ohraničiť jednotlivé bunky počas získavania údajov pre tvorbu Ramanovho spektra. Technika využíva laserovu pascu generovanú priamo namiereným Gaussovským laserovým lúčom do samostatných buniek, ktoré sú potom imobilizované v tomto laserovom ohnisku. Jeden laserový lúč je použitý pre optické zachytávanie a druhý pre Ramanovu spektroskopiou. Možno však využívať iba jeden laserový lúč, ktorý bude súčasne slúžiť aj na zachytávanie a aj na meranie. Detekcia zachytených buniek prebieha pomocou

spektrometra a konfokálneho detekčného nastavenia [4]. Analyzovať viacero buniek naraz môžeme pomocou multifokálnej LTRS. Najvhodnejšie sú na analýzu malé bunky s podobným objemom (u ktorých pomer bunky k ohniskovému objemu je rovný jednej). Tieto bunky sú najľahšie zachytené a výsledné Ramanove spektrum odpovedá celkovej biochemickej kompozícii danej častice [22].

#### **2.4.2 Analýza bakteriálnych buniek pomocou Ramanovej spektroskopie**

Ramanova spektroskopia umožňuje identifikáciu a rozlíšenie baktérií vďaka detekcii a určeniu dôležitých molekulových komplexov v biologických vzorkách. Okrem podávania detailnej informácii o vnútri bunky – identifikácii biomolekúl, dokážeme pomocou tejto techniky detekovať a merať aj externé chemikálie (antibiotiká, lieky proti rakovine), ktoré sú začlenené do jej vnútra [4]. Využitím nanosenia kovových nano-častíc na bakteriálnu membránu alebo značením buniek týmito časticami môžeme zosilniť Ramanov proces. Jeho zosilnenie je možné aj použitím povrchov s nano-štruktúrou. Týchto úprav sa využíva pri povrchovo zosilnenej Ramanovej spektroskopii (SERS) [23].

Jednou z využitia Ramanovej spektroskopie je aj identifikácia PHA produkovaných baktériami. V jednej z prvých štúdií, v ktorej sa preukázalo toto využitie bol zistený vplyv veku mikroorganizmu (rastová fáza) na jeho biochemickú kompozíciu. To v akej fáze rastu sa mikroorganizmus nachádzal ovplyvnilo aj množstvo detekovaných PHA v jeho bunkách. Baktéria akumuluje PHA v rôznych formách podľa stavu bunkovej aktivity (v stacionárnej fáze – kryštalické PHA, v exponenciálnej – amorfné PHA). Ramanove spektrá baktérie v exponenciálnej fáze dominovali vďaka signálom určitého materiálu, ktorý sa v bunkách hromadil. Akumulácia PHB v baktérii pozmení Ramanove spektrá. Pásky v Ramanovom spektre prislúchajúce proteínom, lipidom a nukleovým kyselinám nie sú úplne zatienené signálmi z PHB. Ramanova spektroskopia môže byť využitá na identifikáciu PHA pokiaľ baktéria nedosiahne stacionárnu fázu [26]. Ďalšia štúdia taktiež využíva Ramanovu spektroskopiu k stanoveniu obsahu PHB v bakteriálnych bunkách. PHB je v tomto experimente produkovaný baktériou *Cupriavidus necator* H16. Bunky s rôznym obsahom PHB boli priradené ku zvoleným interným štandardom podľa daných Ramanových spektier uvedeného bakteriálneho kmeňa [8]. Vďaka úspešnému použitiu Ramanovej spektroskopie na kvalitatívnu analýzu PHA v predchádzajúcich prácach, bola táto metóda zvolená v experimentálnej časti tejto práce.

### **2.5 Elektrónová mikroskopia**

Do začiatku 20. storočia bolo možné pozorovať objekty pomocou svetelného mikroskopu maximálne 1 000-krát zväčšené (voči ich viditeľnej veľkosti) a rozlišovacia schopnosť medzi dvomi časticami bola 0,2  $\mu\text{m}$ . Objav elektrónovej mikroskopie v 30. rokoch 20. storočia umožnil pozorovať submikroskopické štruktúry (až do veľkosti 1 nm). Použitie elektrónového mikroskopu prinieslo prvé informácie o vírusoch, DNA a o veľa rôznych malých organelách. Elektrónový zväzok môže mať kratšiu vlnovú dĺžku ako viditeľné svetlo a preto nám tento typ mikroskopie umožní pozorovať omnoho menšie objekty [28].

Elektrónová mikroskopia si nájde uplatnenie v medicíne, biológii, výskume materiálov, výrobe polovodičov, forézno-vedeckých laboratóriách, ale aj v iných odvetviach [29]. Dokážeme pomocou nej vizualizovať biologické materiály, ale aj zisťovať ich fyzikálne vlastnosti a chemickú kompozíciu. Práve elektrónová mikroskopia nesie zásluhu za objavenie

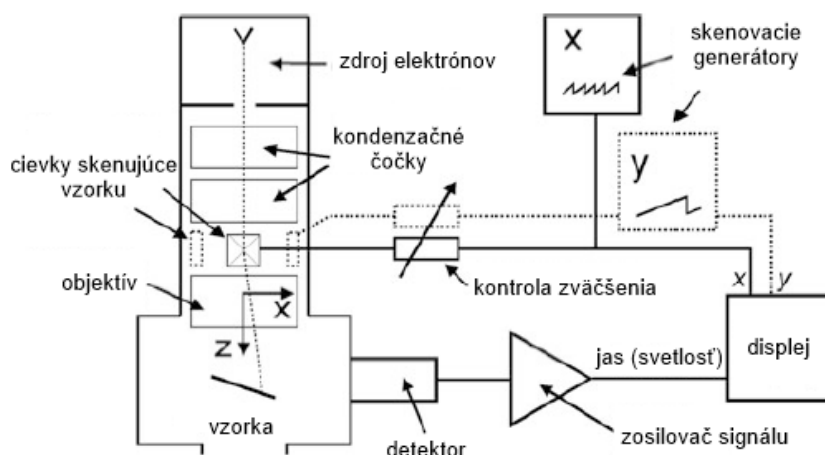
a detailné zobrazenie prakticky všetkých organel a bunkových inklúzií. Medzi dva základné typy elektrónovej mikroskopie patrí SEM a TEM [28]. Kapitola 2.5.1 pojednáva práve o SEM.

### **2.5.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia**

Informácie o povrchu objektu poskytuje skenovacia elektrónová mikroskopia [28]. Podľa kontrastu obrazu získaného detekciou späťne odrazených elektrónov môžeme rozlíšiť oblasti s rôznym prvkovým zložením. Ťažšie prvky tvoria miesta svetlé (do detektoru sa dostalo viac elektrónov zo vzorky a na detektore vznikol signál s vyššou intenzitou). Naopak tmavé miesta obrazu sú tvorené ľahkými prvkami. Umožňuje avšak nielen kvalitatívnu analýzu, ale vďaka vzniku iných signálov v komore preparátu (porovnaných s vhodným štandardom), aj kvantitatívnu [29]. SEM poskytuje rozlíšenie obrazu nachádzajúce sa medzi hodnotami 1 a 10 nm a taktiež desaťkrát väčšie zväčšenie obrazu v porovnaní s klasickým svetelným mikroskopom. 10 000-násobné zväčšenie pôvodnej veľkosti dosiahneme teda pomocou SEM [29,30]. Pomocou tejto mikroskopie získame fotografie s relatívne veľkou hĺbkou ostrosti. Môžeme teda ostro rozoznať aj určité rysy (črty) vo vzorke, ktoré sa nachádzajú mimo roviny zaostrenia. SEM využíva primárne elektróny, ktoré dodávajú energiu atómovým elektrónom vzorky. Zo vzorky sú potom generované sekundárne elektróny, ktoré sú detekované detektorom sekundárnych elektrónov a poskytujú informáciu o topografii vzorky. Pri použití skenovacieho módu sú primárne elektróny orientované do elektrónovej stopy malého priemeru. Táto stopa je skenovaná naprieč vzorkou pomocou elektrostatického alebo magnetického poľa meniaceho smer dopadajúceho lúča. Skenovací mód umožňuje simultánne skenovanie v dvoch kolmých dráhach. Vďaka tomu môžeme snímať aj štvorcové alebo obdĺžnikové plochy vzorky. Analytický elektrónový mikroskop zostavíme pripojením röntgenového (RTG) spektrometru k SEM. Meraním RTG energie môžeme identifikovať atómové čísla daných atómov. Ak charakteristické RTG signály použijeme na kontrolu intenzity skenovaného, zostavíme tak prvkovú mapu. Z mapy je viditeľné rozmiestnenie chemických prvkov v rámci SEM vzorky [30].

Prvý skenovací elektrónový mikroskop založený na sekundárnej emisii bol zostrojený v roku 1942 (Zworykin, RCA Laboratories) [28,30]. Schéma zariadenia je ilustrovaná na obr. 7. Skenovací elektrónový mikroskop sa skladá zo zdroja elektrónov (napr. wolfrámové vlákno), osovo symetrických magnetických čočiek, objektívu, ktorý určuje priestorové rozlíšenie SEM. Keďže skenovanie prebieha v dvoch kolmých smeroch  $x$  a  $y$ , súčasťou zostavy SEM sú aj skenovacie generátory, cievky skenujúce vzorku. Výstupy z generátorov sú zobrazené na displeji zariadenia ako SEM fotografie. Skenovacie signály sú generované digitálne, čo umožňuje rozdelenie obrazu na jednotlivé pixely. Zmena jasu je realizovaná elektricky pôsobením signálu detektora na konkrétny pixel. Úpravou zväčšenia ovplyvníme rýchlosť skenovania. Pri väčšom zväčšení dostaneme kvalitnejší snímok obsahujúci menej elektrického šumu, ale skenovanie je veľmi pomalé. Ak zaznamenávame niekoľkých snímok (okolo 50 alebo 60) za sekundu pracujeme pri nižšom zväčšení [30]. Pri používaní SEM sa však môžeme stretnúť s určitými problémami ako sú vytvorené biele riadky vo výslednom obraze alebo jeho posuv. Dochádza k tomu vďaka nahromadeniu priestorového náboja na povrchu preparátu (ak nie je dostatočne vodivý). Taktiež sa môže preparát poškodiť

ohrevom, ktorý vzniká vďaka sústredeniu veľkej prúdovej hustoty do malej plochy. Preparáty pozorované prostredníctvom SEM by mali byť teda stabilné pri ožiarení elektrónovým lúčom. Navyše by mali vykazovať stabilitu vo vákuu, ktoré sa pri meraní využíva. Pomocou magnetického poľa stigmátoru musíme počas mikroskopovania korigovať osový astigmatizmus (v dôsledku ktorého majú elektróny prechádzajúce šošovkou rôzne ohnisko). Správnym nastavením stigmátoru vie byť tento problém odstránený používateľom na rozdiel ostatných uvedených väd. Sféricú vadu, ktorá spôsobuje, že pri dopade širokého zväzku lúčov na šošovku sa paraxiálne lúče stretávajú za šošovkou v inom bode ako okrajové, možno skorigovať pomocou clony. Problémom je aj chromatická vada tvorená kolísaním urýchľovacieho napätia, keďže elektróny nemajú rovnakú energiu [29].



Obr. 7 Schéma skenovacieho elektrónového mikroskopu, skenovanie v rovine x označné:  $\_$ , y: ... (upravené) [30]

### 2.5.1.1 Kryogénna skenovacia elektrónová mikroskopia

Kryo-SEM umožňuje získavať informácie z povrchu zmrazených vzoriek. Zadržuje sa v nich značná časť prirodzene prítomnej vody a po zamrznutí máme uchovanú pôvodnú štruktúru vzorky. Zmrazenie vzorky zabezpečí, že zostane hydratovaná aj pri použití vysokého vákuu počas merania. Výhodou je aj jej relatívna rýchlosť (iba niekoľko prípravných krokov) pre dosiahnutie stredne vysokého rozlíšenia [31,32]. Kryo-SEM je jedinou vhodnou technikou k vizualizácii prirodzenej trojfázovej štruktúry materiálov. Môžeme tak skúmať prirodzené vlastnosti vzorky bez toho aby boli ovplyvnené použitou chemickou látkou pri úprave. Pri klasickej chemickej príprave vzorky dochádza napríklad u väčších vzoriek k rozrušeniu ultraštruktúry. Navyše je to taktiež výborná metóda ku štúdiu detailnej morfológie štruktúrnych zmien, pozorovaniu distribúcie vody alebo kryštálov ľadu v štruktúre vzorky, ale aj sledovaniu kontrolovaného uvoľňovania liečiv v organizme [31,32]. Túto mikroskopickú techniku môžeme efektívne využiť pre pozorovanie tenkých rezov buniek, ktoré sú spevnené vďaka zmrazeniu. Mikroskopovanie pri nízkej teplote však vyžaduje náročnejšie technické vybavenie a pri manipulácii so zmrazenými vzorkami a rezmi sa môžu objaviť problémy. Takéto preparáty sa musia skladovať pri teplote pod  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby nedochádzalo k rekryštalizácii ľadu a poškodeniu zafixovanej vzorky [29]. Aj keď kryo-SEM nie je metóda

vhodná pre skúmanie všetkého, môže byť využívaná v spojení s inou technikou. Používa sa napríklad ako primárna inštrumentačná technika pre röntgenové (x-ray) analytické štúdie. SEM pri nízkej teplote sa používa najmä na štúdium rastlinných a pľúcnych tkanív [32]. Jednotlivé metódy úpravy vzorky na pozorovanie pomocou SEM (aj na kryo-SEM) budú opísané v nasledujúcej kapitole (kapitola 2.5.1.2).

#### **2.5.1.2 Analýza bakteriálnych buniek a stanovenie PHA v nich pomocou SEM**

Pred analýzou biologických vzoriek pomocou SEM je nutná úprava odobratej vzorky (najmä odstránenie vody), ktorá zahŕňa niekoľko krokov podľa zvolenej metódy (fyzikálne, chemické, chemicko-fyzikálne, niektoré vzorky bez spracovania). Metódy úpravy vzoriek na analýzu pomocou SEM s postupom úpravy sú uvedené v schéme na obr. 8. Po odbere biologickej vzorky vykonávame v prípade potreby aj jej čistenie [29].

Medzi fyzikálne metódy úpravy biologických vzoriek, ktoré využijeme pri pozorovaní vzoriek pomocou kryo-SEM, patria mrazové metódy (mrazové lámanie, leptanie) alebo mrazové sušenie. Obe využívajú kryo-fixáciu. Kryofixácia môže byť realizovaná immerznou (ponorením vzorky do chladiacej látky), sprejovo (vstreknutím kvapiek suspenzie do chladiča) alebo aj prúdovým mrazením (lepšia alternatíva sprejovej kryofixácie). Kvapalný dusík si nájde uplatnenie pri mrazení pomocou kovového zrkadla, ale aj pri mrazení pri vysokom tlaku [29]. Vysoký tlak spomaľuje kryštalizáciu a dochádza k tvorbe zamrznutej vzorky vo vitrifikovanom (sklovitom) stave (teda bez kryštálov ľadu) [33]. Pri kryo-fixácii (zosklení) dochádza k zvyšovaniu viskozity vzorky na tak vysokú hodnotu, že pohyb molekúl sa stane zanedbateľným predtým ako sa začnú tvoriť kryštály ľadu. Výhodou tohto procesu je to, že efektívne imobilizujeme dynamické procesy a dostaneme matricu pevného skupenstva vhodnú na pozorovanie pod mikroskopom. Nie je vždy jednoduché dosiahnuť vitrifikáciu. Dôležité je vyhýbať sa heterogénnej nukleácii a to použitím veľmi čistých roztokov alebo rozdelením vzoriek do malých kvapiek z ktorých niektoré nebudú obsahovať nukleačné zárodky [31]. Výhodné je aj používať veľmi malé vzorky a/alebo pridávať protimrazové látky (kryoprotektanty). Tieto látky znižujú teplotu homogénnej nukleácie, znižujú množstvo voľnej vody v systéme, zvyšujú rekryštalizačnú teplotu a tým spomalia kryštalizačný proces [29,31]. Avšak kryoprotektanty majú nepriaznivý účinok na štruktúru a biochémiu bunky. Spomaliť kryštalizáciu môžeme aj podchladením vzorky, čo sa však ťažko dosahuje (chladenie musí byť rýchlejšie ako čas kryštalizácie) [31]. Avšak nevýhodou vysokotlakového mrazenia je nutnosť využitia špeciálnej aparatury a použitie len vzoriek tenších ako 600 µm [31,33]. Mrazové lámanie a leptanie sú metódy vhodné pre získanie detailov štruktúry povrchu buniek. Mrazové leptanie sa neaplikuje na bakteriálne bunky, pretože je vhodné na štúdium vzťahu medzi zložkami cytoskeletu v bunke (absencia u baktérií). Mrazové lámanie, pri ktorom vznikajú prierezy zmrazených vzoriek, je ale uplatniteľné pri štúdiu vnútra membrán (napr. sledovanie distribúcie a lokalizácie integrálnych membránových proteínov). Ak nedisponuje aparatura kryo-SEM držiakom na vzorku, môžeme použiť mrazové sušenie. Táto úprava zahŕňa po zmrazení vzorky jej sublimáciu vo vákuu, lepenie na vhodnú podložku (napr. pri baktériách) a následné pokovovanie kvôli dosiahnutiu tieňovania obrazu. Táto technika sa taktiež využíva ku štúdiu štruktúry povrchu [29,33]. Fixovaním sa snažíme

nielen povrch preparátu spevniť pre pozorovanie, ale aj zachovať bunky v natívnom stave (stav akoby boli živé), a preto je kryofixácia vzoriek vhodnejšia ako ďalej opísaná chemická fixácia [29,34].

Úprava biologických (bakteriálnych) vzoriek môže byť realizovaná aj pomocou chemických metód. Ako bolo spomenuté v kapitole o kryo-SEM (2.5.1.1), takéto metódy sú v porovnaní s kryo-technikami menej výhodné kvôli častej deštrukcii biologickej vzorky, ktorú spôsobujú. Používajú sa aldehydy ako sú formaldehyd alebo glutaraldehyd (prípadne ich kombinácia), ktoré zvyšujú osmolalitu vzorky. Formaldehyd sa používa na fixáciu väčších vzoriek, keďže vďaka štruktúre jeho molekuly preniká do vzorky rýchlo. Používa sa obmedzene (napr. pre preparáty k imunoznačeniu), pretože výsledná ultraštruktúra vzorky je nižšej kvality. Jeho kombináciou s glutaraldehydom vznikne Karnovského fixačné činidlo, ktorým dosiahneme lepších výsledkov (rýchla a zároveň kvalitná fixácia). Kvalitná fixácia je zabezpečená pomocou glutaraldehydu, pretože umožňuje efektívnejšie sieťovanie. Jeho penetrácia do vzorky je pomalšia a preto Karnovského činidlo obsahuje formaldehyd, ktorého výhodou je práve rýchle prenikanie do vzorky. Toto činidlo je aj po zriedení hypertonické a takto sa používa na fixovanie mono-vrstiev a bunkových suspenzií [34]. Fixačný roztok s vyššou koncentráciou glutaraldehydu ako 70 % obsahuje degradačné produkty a pri poklese pH pod 3 sa zvýši obsah kyseliny glutarovej. Má nepriaznivý vplyv na kvalitu fixácie a musíme ju odstraňovať. Na kvalitu fixácie, ale aj rýchlosť má vplyv množstvo O<sub>2</sub>, preto je nutné vzorku prevzdušňovať. Samostatný glutaraldehyd fixuje lepšie tenké vzorky. Pri fixácii reaguje s peptidami a bielkovinami a zachováva bunkové membrány permeabilné. Oxid osmičelý je v tomto smere šetrnejší, lebo nepreniká do vnútra vzorky takou rýchlosťou a zostáva na povrchu, čím dochádza aj k spevneniu pozorovaného objektu. Taktiež je výhodou aj jeho nízky osmotický účinok a zvýšenie priepustnosti membrán po jeho použití. Využiť sa dá aj fixácia preparátu v parách oxidu osmičelého, ktorý zároveň preparát dosuší. Takto sa fixujú napríklad bunky, pri ktorých môže dochádzať k poškodeniu ich povrchu. Pri chemickej fixácii sa využívajú aj tlmivé roztoky (napr. fosfátový pufr) [29].

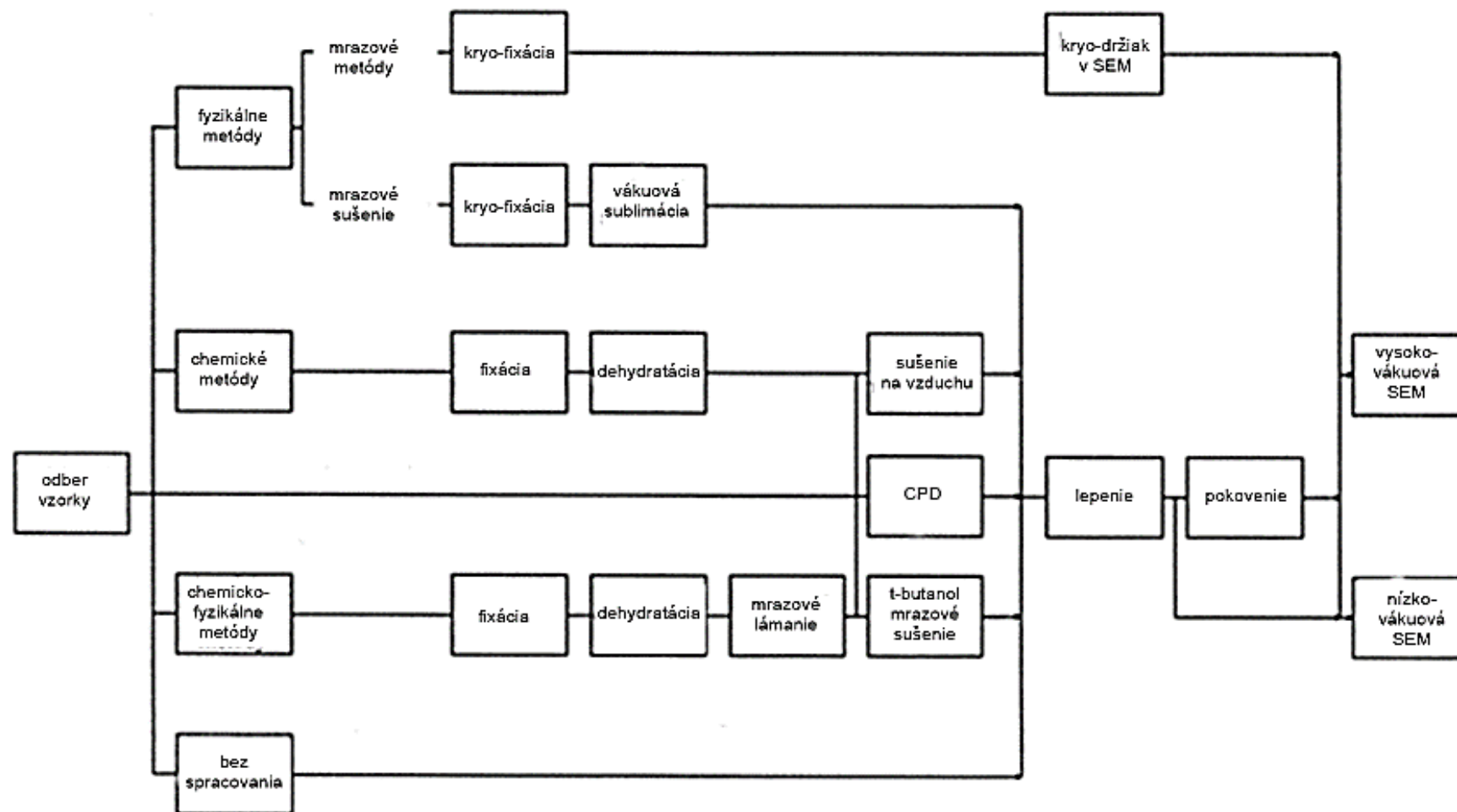
Po nahradení vody vo vzorke etanolom, acetónom alebo iným organickým rozpúšťadlom (dehydratácii) nasleduje sušenie. Sušením odstraňujeme dehydratačné činidlá alebo iné rozpúšťadlá. Používa sa sušenie metódou kritického bodu alebo sušenie vzduchom. CPD (critical point drying) – metóda kritického bodu s kvapalným CO<sub>2</sub> je ale najčastejšou sušiacou technikou aj napriek viacerým nevýhodám (dlhá príprava vzorky, drahé zariadenie na kvapalný CO<sub>2</sub>). Ďalšou nevýhodou je, že táto metóda sušenia nie je vhodná pre vzorky, ktoré sú citlivé na zmeny tlaku alebo teploty. V takomto prípade môžeme sušiť vzorky na vzduchu. Musíme však používať dehydratačné kvapaliny s nízkym povrchovým napätím, pretože povrchové napätie spôsobuje poškodenie vzorky [29,35]. Príkladom môže byť HMDS (hexametyldisilazán). Redukované povrchové napätie HMDS zosilní vzorky počas sušenia a zabráni tak ich lámaniu. Presný mechanizmus pôsobenia HMDS na biologické vzorky nie je objasnený. Vhodnosť jeho použitia ako sušiaceho činidla sa prisudzuje jeho vlastnostiam ako sú nízke povrchové napätie alebo potenciál sieťovania [35].

Po lepení na vhodnú podložku (najčastejšie hliníkovú) koloidným striebrom alebo pre malé objekty sa volí uhlíková či adhézna páska, nasleduje pokovovanie. Pri pokovovaní (najčastejšie zlatom, platinou) dochádza k zvýšeniu povrchovej vodivosti materiálu. Takáto



kovová vrstva slúži nielen ako ochrana vzorky pred teplom uvoľneným primárnymi elektrónmi, ale aj odvádza negatívny náboj, či zvyšuje produkciu sekundárnych elektrónov. Nedochádza teda ani k stratám ostroty obrazu [29].

Analýza PHA v bakteriálnych bunkách môže byť realizovaná aj pomocou kryo-SEM. Ultraštruktúra baktérií, ktoré PHA akumulujú, bola pozorovaná pomocou tejto mikroskopie už na začiatku druhej polovice 20. storočia. Pri úprave vzorky sa využila metóda mrazového lámania. PHA granule vykazovali plastickú deformáciu a veľké predĺženie materiálu [36]. Aj v ďalšej štúdii bola pomocou kryo-SEM pozorovaná v bunkách plastická deformácia PHB, ktorá mala ihlicovitý tvar. Tieto ihlicovité štruktúry ale neboli prítomné v bakteriálnych bunkách, ktoré nedokážu tento polymér akumulovať (nachádza sa v ich bunkách len v zanedbateľnom množstve). Mechanizmus deformácie síce nie je objasnený, ale je zrejmé, že zmrazené PHB granule vykazujú úplne odlišné mechanické a fyzikálne-chemické vlastnosti v porovnaní s inými komponentami bakteriálnej cytoplazmy. Taktiež flexibilita týchto granúl vnútri baktérií je neporovnateľne vyššia ako pri ich izoláciách z bakteriálnych buniek (predĺženie materiálu viac ako 100 % v porovnaní s okolo 4 % pri izolovaných PHB). Navyše prítomnosť PHB v bunkách baktérií nielen chráni bunky pred poškodením spôsobeným ľadom z vonkajšieho prostredia, ale zabraňuje aj tvorbe ľadu vnútri buniek. PHB granule môžu slúžiť teda aj ako kryoprotektant [37].

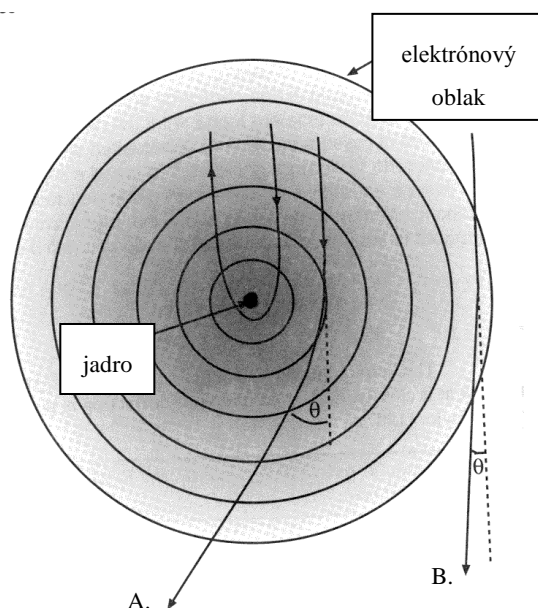


Obr. 8 Postupy prípravy vzorky na analýzu pomocou SEM (upravené) [29]

### 2.5.2 Transmisná elektrónová mikroskopia

Medzi elektrónové mikroskopy patrí aj transmisný elektrónový mikroskop. Princípom TEM je, že pri pozorovaní kryštalickej vzorky pevného skupenstva dochádza k transmisnému elektrónovému rozptylu. Tento jav je spôsobený elektrónmi odrazenými od rovín atómov materiálu. Použitím vhodných šošoviek sú tieto elektróny zobrazované. Prvé transmisné elektrónové mikroskopy využívali horizontálne usporiadanie viacerých šošoviek. Kvôli dosiahnutiu lepšieho rozlíšenia sa začali neskôr šošovky ukladať vertikálne (v smere optickej osi). Gravitačná sila, ktorá pôsobí paralelne na optickú os umožní dobré usporiadanie udržiavané po dlhší čas a mechanické skreslenie bude menej rušivé [30].

Pri TEM sa obraz tvorí vďaka interakcii elektrónového zväzku so vzorkou. Medzi takéto interakcie patrí elastický rozptyl a neelastický rozptyl (viď obr. 9). K prvej spomenutej interakcii dochádza, keď pri prelete urýchleného elektrónu elektrónovým oblakom atómu dochádza k jeho vychýleniu pod uhlom (až  $180^\circ$ ). Elektrón môže byť spätne odrazený a jeho energia sa nemení. Rozptýlené elektróny prispievajú k tvorbe kontrastu obrazu. Pri neelastickom rozptyle sa zrážajú primárne elektróny s elektrónmi na orbitáloch atómu vzorky. Urýchlené primárne elektróny môžu stratiť veľkú časť energie, pretože sa jedná o zrážku dvoch častíc s rovnakou hmotnosťou. Elektróny sa však neodchýlia z pôvodnej dráhy. Keďže dochádza k zmene vlnovej dĺžky týchto elektrónov, majú vplyv na ostrosť obrazu [29].



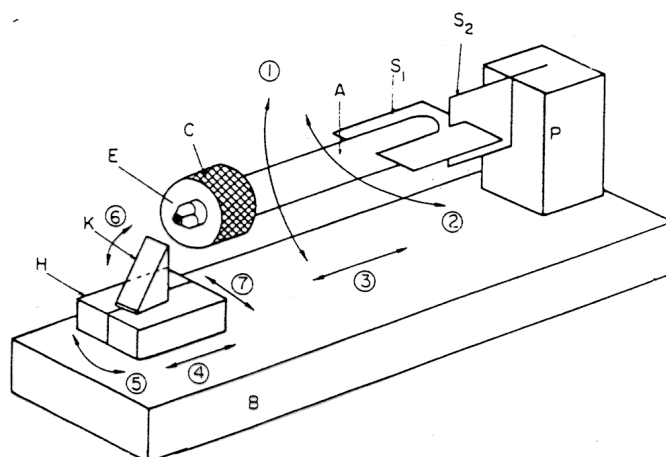
Obr. 9 Znáznornenie interakcií primárneho elektrónu s atómom vzorky: A. elastický, B. neelastický rozptyl (upravené) [29]

Využívané zdroje elektrónov sú žeravená wolfrámová katóda, žeravená  $\text{LaB}_6$  katóda alebo autoemisná tryska. Na vizualizáciu elektrónov, ktoré prešli vzorkou a zobrazovacím systémom využívame tienidlo (najčastejšie pokryté  $\text{ZnS}$ ) umiestnené na dno tubusu. Informácie, ktoré elektróny nesú sú prenesené do oblasti viditeľného svetla. Okrem tohto tienidla sa využíva aj malé tienidlo z rovnakého materiálu slúžiace k zaostrovaniu obrazu.

Záznam obrazu prebieha pomocou CCD kamery alebo na špeciálny fotografický materiál. Aby sa zabránilo zmenám energie a smeru pohybu urýchlených primárnych elektrónov, nesmie dochádzať k ich náhodným zrážkam s molekulami vzduchu. Z tohto dôvodu je vnútorný priestor takéhoto mikroskopu vybavený vákuovým systémom (výkonné vývevy) [29]. Do roku 1931 bol nasnímaný prvý TEM obrázok pomocou dvoj-objektívového mikroskopu. Ernst Ruska takto pomocou TEM pozoroval kovovú mriežku [30].

Príprava biologických preparátov pred pozorovaním pomocou TEM zahŕňa chemickú alebo fyzikálnu fixáciu podobne ako pri SEM. Ďalším krokom postupu je dehydratácia vzoriek. Postupne je všetka voda vo vzorke nahradená rastúcou koncentráciou acetónu alebo etanolu. Tieto dehydratačné činidlá sú na rozdiel od vody miešateľné so zalievacím médiom. Vzorky musíme zalievať do média, aby z nich mohli byť následne pripravené ultratenké rezy. Na zalievanie vzoriek sa používajú špeciálne živice, ktoré spĺňajú viaceré vlastnosti (napr. dostatočná mechanická pevnosť v tenkej vrstve, ich polymerizácia by mala byť rovnomerná, nemali by rozptyľovať primárne elektróny). Používajú sa epoxidové, akrylátové alebo polyesterové živice. Vybraný typ živice ovplyvní konečný vzhľad ultraštruktúry. Živice majú približne rovnaké prvkové zloženie ako preparát a ich rozptyľové vlastnosti sú tiež podobné. Pre odlišenie kontrastu medzi živicom a preparátom a celkovo na zvýraznenie membrán buniek sa do vzorky pridávajú aj ťažké kovy (napr. Os). Zalievanie vzorky prebieha tak, že sa preparát postupne presýti živicom so zvyšujúcou sa koncentráciou. Tento proces sa nazýva infiltrácia. Medzi najčastejšie spôsoby zalievania patrí plošné zalievanie do silikónových foriem alebo zalievanie do kapsulí. Pre naštartovanie polymerácie živice môžeme použiť vyššiu teplotu do 60 °C (pre epoxidové živice), UV žiarenie (pre akrylátové živice) alebo iniciátor/chemický katalyzátor polymerácie v kombinácii s UV alebo teplom [29].

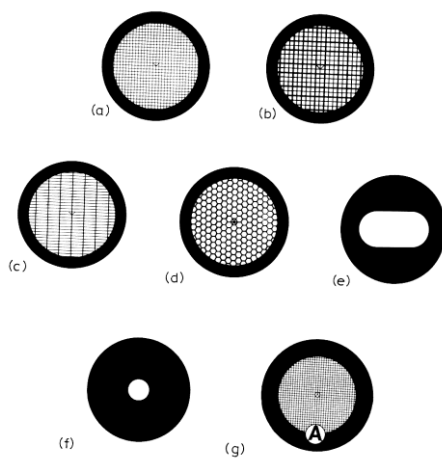
Ak chceme pomocou TEM skúmať ultratenké rezy vzoriek, zaliate preparáty musia byť nakrájané na rezy optimálnej hrúbky 60 – 70 nm. Lepšie rozlíšenie dosiahneme pri tenších rezoch. Kontrast je ale v tom prípade slabší. Najskôr musí byť spolymerovaný bloček s preparátom zrezaný do optimálneho tvaru pomocou žiletky alebo trimovacej frézky. Vzorka je umiestnená do vahadla ultramiktomu (viď obr. 10) a ultratenké rezy sú krájané skleneným alebo diamantovým nožom. Pred krájaním sa musí vytvoriť pri reznej hrane vanička, ktorá sa napustí vodou. Na jej hladinu sa splavujú odkrojené ultratenké rezy. Vznikajú navlhlené a nerovné rezy, ktoré sa vytáhujú napr. pôsobením tepla alebo pár chloroformu. Následne sa rezy zbierajú na sieťky (napr. z Cu, Ni alebo Au) a vzorky sa môžu pozorovať pomocou TEM. Rôzne druhy takýchto sieťok sú uvedené na obr. 11[29].



- E – bloček
- C – držiak objektu
- A – rameno
- S1, S2 – pružinový záves
- P – podpera ramena
- B – základná doska
- K – nôž
- H – križový stolček

Obr. 10 Schéma ultramikrotomu, čísla označujú pohyb častí a šípky ich smer (upravené) [29]

Pokiaľ sú používané veľmi hrubé rezy vzoriek, dochádza k tomu, že elektróny sú skôr silno odrazené alebo absorbované vzorkou ako sú transmitované. Elektróny teda neprejdú vzorkou a nemôžu byť detekované [30]. Maximálna hrúbka vzorky, ktorú môžeme pomocou TEM pozorovať so zachovaním rozlíšenia je 100 nm [29]. Pri porovnaní TEM so SEM má TEM lepšie rozlíšenie (moderné TEM pod 0,2 nm) a podáva informácie o vnútorných detailoch vzorky. Môžeme tak vidieť aj štruktúru organel buniek a nielen bunkovú membránu. Preto budú vybrané vzorky baktérií s vyprodukovanými PHA pozorované aj pomocou tejto mikroskopie. Okrem biológie (rastlinné, živočíšne, bakteriálne bunky a vírusy) si nájde takýto mikroskop uplatnenie najmä pri pozorovaní kryštalických defektov zvaných dislokácií v kovoch [30].



Obr. 11 Rôzne druhy sietok používané na zber ultratenkých rezov vzoriek [29]

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimenty praktickej časti diplomovej práce boli uskutočňované so siedmimi rôznymi termofilnými baktériami. Baktérie boli kultivované v odlišných kultivačných a produkčných médiách, ktoré obsahovali vhodné zložky pre rast danej baktérie a produkciu PHA. Po kultivácii bolo u každej baktérie analyzované množstvo biomasy a PHA pomocou plynovej chromatografie, ktorá slúžila ako referenčná metóda. Bakteriálne bunky boli pozorované pomocou kryogénnej skenovacej elektrónovej mikroskopie a vybraná vzorka baktérii aj pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie. Ramanové spektrá boli nasnímané u všetkých použitých vzoriek baktérií pomocou Ramanovej mikrospektroskopie. Hodnoty nameraných intenzít boli porovnávané s výsledkami z referenčnej metódy.

#### 3.1 Použité chemikálie, prístroje, mikroorganizmy

##### 3.1.1 Použité chemikálie

- Acetón (VWR CHEMICALS, USA)
- Citrát amónno-železitý (Fluka, Švajčiarsko)
- D-Glukóza monohydrát (LACH-NER, Česká republika)
- D-(+)-xylóza (HIMEDIA, India)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lachema, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (LACH-NER, Česká republika)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (LACH-NER, Česká republika)
- Dusík, kvapalný (LINDE, Česká republika)
- Glycerol, bezvodý (LACH-NER, Česká republika)
- Heptahydrát síranu horečnatého (LACH-NER, Česká republika)
- Hydroxid sodný (LACH-NER, Česká republika)
- Chlorid amónny (LACH-NER, Česká republika)
- Chloroform (LACH-NER, Česká republika)
- Izopropanol (VWR CHEMICALS, USA)
- Kvasničný extrakt (HIMEDIA, India)
- Kyselina benzoová (VWR CHEMICALS, USA)
- Kyselina sírová (LACH-NER, Česká republika)
- Lecitín, sójový
- Metanol (VWR CHEMICALS PROLABO, USA)
- Nutrient broth, komplexné médium (HIMEDIA, India)
- Oxid osmičelý, kryštálky (Electron microscopy science, Hatfield)
- Trypton Soya Broth médium (HIMEDIA, India)
- Živica, epoxidová, Epoxy Embedding Medium kit (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Všetky chemikálie boli použité v čistote p.a. a vyššej.

### 3.1.2 Použité prístroje

- Analytické váhy PIONEER model PA 224C, OHAUS
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf
- Centrifuga U-32R – Boeco
- Centrifuga VWR Compact Star CS4
- Kryo-prípravná vákuová komora ACE600, Leica Microsystems
- Laboratórne sklo a vybavenie
- Laminárny box Aura mini, BioAir – Euroclone
- Laminárny box Biohazard Airstream, ESCO
- Magnetická miešačka, Kartell, TKO
- Plynový chromatograf s plameňovo-ionizačným (FID) detektorom, Thermo Scientific, Trace 1300; kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Ramanov mikroskop, RENISHAW inVia
- Skenovací mikroskop Magellan 400/L vybavený Schottky emisnou pištoľou, kryo-systémom, s možnosťou STEM módu, katódo-luminiscenčnej analýzy, EDX analýzy a EBSD analýzy
- Spektrofotometer NanoPhotometer Pearl – Implen
- Substitučná jednotka EM AFS2, Leica Microsystems
- Temperovaná trepačka, IKA Incubator shaker KS 4000 i control
- Termoblok, Stuart SBH200D
- Termostat, VWR INCU-LINE
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vortex, Kartell, TK3S
- Vysokotlaký mraziaci prístroj EM ICE, Leica microsystems

### 3.1.3 Použité mikroorganizmy

K experimentálnej časti práce bol využitý izolát 34, ktorý bol izolovaný z čističky odpadných vôd v Brne (Modřice). Izolát 34 bol klasifikovaný na základe sekvenácie génu *16S rRNA* ako *Chelatococcus composti* [38]. Ostatné bakteriálne kultúry boli dodané v lyofilizovanom stave a po oživení kultúr z nich boli pripravené kryo-konzervy. Použité baktérie sú uvedené v tab. 1.

Tab. 1 Zoznam bakteriálnych kultúr použitých v experimentálnej časti práce

Názov baktérie	Zbierkové číslo	Zbierka
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	DSM 15344	nemecká
<i>Schlegelella aquatica</i>	LMG 23380	belgická
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	DSM 14834	nemecká
<i>Tepidomas taiwanensis</i>	LMG 22826	belgická
<i>Rubrobacter spartanus</i>	DSM 102139	nemecká
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	DSM 9941	nemecká
Izolát 34	x	x

## 3.2 Kultivácia mikroorganizmov

### 3.2.1 Kultivácia bakteriálnych inokúl

Pre baktérie rodu *Rubrobacter* bolo pripravené 5-krát zriedené komerčne dostupné živné médium Tryptone Soya Broth (TSB, koncentrácia 30 g/l, zloženie vid' tab. 2). Ostatné baktérie boli kultivované v komerčne dostupnom živnom médiu Nutrient broth (NB, koncentrácia 25 g/l, zloženie vid' tab. 3), ktoré bolo taktiež pripravené. Všetky banky boli premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Banky so živným médiom boli po ochladení na teplotu približne 50 °C naočkované príslušnými bakteriálnymi kultúrami v sterilných podmienkach (laminárnom boxe). Inokulá boli kultivované paralelne v 100 ml Erlenmeyerových bankách s 50 ml objemom média 24 hodín pri 50 °C a otáčkach 170 rpm.

Tab. 2 Zloženie kultivačného média Trypton soya broth pre baktérie rodu *Rubrobacter*

zložka média TSB	c [g/l]
trypton	17
pepton sójový	3
NaCl	5
dextróza (glukóza)	2,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5

Tab. 3 Zloženie kultivačného média Nutrient broth pre všetky baktérie okrem rodu *Rubrobacter*

zložka média NB	c [g/l]
pepton	10
hovädzí extrakt	10
NaCl	5

### 3.2.2 Kultivácia baktérií v minerálnom produkčnom médiu

Bolo pripravené minerálne produkčné médium pre bakteriálne bunky (zloženie vid' tab. 4). Substráty pre bakteriálne bunky boli pridané do jednotlivých baniek podľa tab. 5. Roztok stopových prvkov TES II bol pridávaný až po sterilizácii, pretože bol predtým pripravený a sterilizovaný samostatne. Substráty boli pridané v koncentrácii 20 g/l do určených Erlenmeyerových baniek podľa tab. 5. Glycerol bol pridaný pred sterilizáciou. Ostatné substráty (glukóza, xylóza) boli pridávané ako vopred sterilizované roztoky po sterilizácii. Roztok minerálneho produkčného média bol rozliaty do všetkých baniek. Banky premiešané, uzavreté zátkami a sterilizované. Po sterilizácii boli uchovávané do preočkovania inokúl v termostate pri teplote 50 °C (24 hodín). Glukóza a xylóza boli pridané do určených baniek podľa tab. 5. Do všetkých baniek bol pridaný 100 µl roztoku TES II (zloženie vid' tab. 6) a boli naočkované množstvom bakteriálnej kultúry z inokula odpovedajúcom 10% objemu média. Bakteriálne bunky boli kultivované paralelne v 100 ml Erlenmeyerových bankách s 50 ml objemom média 72 hodín pri 50 °C a otáčkach 170 rpm (vid' obr. 12).



Tab. 4 Zloženie minerálneho produkčného média

<b>zložka</b>	<b>koncentrácia [g/l]</b>
NH <sub>4</sub> Cl	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	9
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,02
Fe(III)NH <sub>4</sub> – citrát	0,0012
kvasničný extrakt	0,5
<b>zložka po sterilácii</b>	
TES II	1 ml/l

Tab. 5 Substráty pre bakteriálne bunky

<b>Názov baktérie</b>	<b>substrát</b>
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	xylóza
<i>Schlegelella aquatica</i>	glukóza
<i>Thermomonas hydrothermalis</i>	glukóza
<i>Tepidomas taiwanensis</i>	glukóza
<i>Rubrobacter spartanus</i>	glycerol
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	glukóza
Izolát 34 ( <i>Chelatococcus composti</i> )	glukóza

Tab. 6 Zloženie roztoku stopových prvkov TES II

<b>zložka</b>	<b>koncentrácia [g/l]</b>
EDTA	50 g
FeCl <sub>3</sub>	8,3 g
ZnCl <sub>2</sub>	0,84 g
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,13 g
MnCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,016 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g
destilovaná voda	1 000 ml



*Obr. 12 Banky s bakteriálnymi bunkami v minerálnom produkčnom médiu počas kultivácie*

### **3.3 Stanovenie obsahu biomasy**

Obsah biomasy bol stanovovaný po 72 hodinách kultivácie. U všetkých vzoriek bolo použité spektrofotometrické a gravimetrické stanovenie obsahu biomasy.

#### **3.3.1 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy**

Vzorky boli nariadené podľa potreby destilovanou vodou a koncentrácia biomasy bola stanovovaná meraním absorbancie. Meranie bolo uskutočnené v triplikátoch kvôli štatistickej váhe dát pri 630 nm proti destilovanej vode ako blanku.

#### **3.3.2 Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy**

10 ml odobratých z každej banky so suspenziou bolo odstredovaných 5 minút na centrifúge pri otáčkach 6 000 rpm. Odber z každej banky bol realizovaný paralelne. Supernatant bol zo skúmaviek odliaty a sediment bol rozsuspendovaný s 1 ml destilovanej vody. Obsah skúmaviek bol prevedený do menších centrifugačných skúmaviek a boli stáčané na centrifúge 4 minúty pri otáčkach 1000 rpm. Supernatant bol odliaty a obsah skúmavky bol sušený v sušiarňi 24 hodín. Po vysušení boli skúmavky zvážené a bola určená koncentrácia biomasy v g/l.

### **3.4 Stanovenie obsahu PHA v biomase a jej koncentrácie**

Biomasa z jednotlivých vzoriek bola analyzovaná na plynovom chromatografe s FID (plameňovo-ionizačnou) detekciou na obsah PHA. Vzorky bolo nutné štandardizovať s použitím rovnakého množstva vnútorného štandardu, pretože plynová chromatografia nepatrí medzi absolútne metódy. Interným štandardom (ISTD) bola transesterifikačná zmes, ktorá obsahovala 5 mg/ml kyselina benzoová v 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v metanole. Kyslou hydrolýzou a následnou esterifikáciou vznikli prchavé metylestery 3-hydroxyalkanových kyselín, ktoré možno analyzovať plynovou chromatografiou.

### **3.4.1 Príprava štandardov pre kalibračnú závislosť**

Bola pripravená kalibračná rada pre stanovenie obsahu PHB v jednotlivých vzorkách navážením známych množstiev štandardu PHB v rozmedzí 2–10 mg. Určené množstvá boli navážené do krimpovacích vialiek, do ktorých bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi. Po zakrmpovaní bol obsah vialiek esterifikovaný v termobloku 180 min. pri teplote 94 °C. Po vychladení bola zmes extrahovaná 500 µl 0,05 M NaOH. Po oddelení fáz bolo do novej skrutkovacej vialky pipetovaných 900 µl izopropanolu a 50 µl spodnej fázy (obsahovala methylestery kyselín). Štandardy boli analyzované na plynovom chromatografe s FID detektorom.

### **3.4.2 Príprava vzoriek na ich analýzu plynovou chromatografiou**

Do krimpovacích vialiek bolo navážené množstvo 9–11 mg biomasy z gravimetrického stanovenia. 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi bolo pridaných do vialky. Po zakrmpovaní bol obsah vialiek esterifikovaný v termobloku 180 min pri teplote 94 °C. Po vychladení bola zmes extrahovaná 500 µl 0,05 M NaOH. Po oddelení fáz bolo do novej skrutkovacej vialky pipetovaných 900 µl izopropanolu a 50 µl spodnej fázy (obsahovala methylestery kyselín). Vzorky boli analyzované na plynovom chromatografe. Pri väčšine vzoriek bolo uskutočnené paralelné stanovenie. U niektorých vzoriek bol navážený v gravimetrickom stanovení nízky obsah biomasy a preto bola uskutočnená navážka len do jednej vialky.

## **3.5 Analýza vzoriek pomocou mikroskopických techník**

Pred pozorovaním vzoriek pomocou kryo-SEM a TEM boli vzorky zmrazené a uchovávané v tekutom dusíku až do prípravy jednotlivých vzoriek na mikroskopovanie.

### **3.5.1 Vysokotlakové mrazenie vzoriek**

Z každej banky so suspenziou bolo paralelne odobratých 10 ml. 1 ml koncentrovanej bakteriálnej suspenzie bol prevedený do skúmaviek typu ependorfiek, ktoré boli stáčané na centrifuge 3 minúty pri otáčkach 3000 rpm. Malé množstvo biomasy zo vzorky bolo po odstredení napipetované na carrier (medený tanierik s vrstvou zlata) o veľkosti 6 mm pre SEM alebo 3 mm s tenkou vrstvou 1% sójového lecitínu pre TEM. Carriery boli prikryté vrchnou časťou a vložené do cartridge (zásobníka) vysokotlakového mraziaceho prístroja (HPF prístroj). Pri použití vysokého tlaku (približne 2 000 bar), ktorý musel byť udržiavaný počas celého procesu nedochádza počas zmrazenia vzoriek k tvorbe ľadových kryštálov a zachováme natívnu štruktúru buniek.

Z HPF prístroja boli carriery so vzorkami prenesené do vane s tekutým dusíkom. V prostredí tekutého dusíka boli carriery vložené do zásobníka, ktorý bol prenesený do kanistra Dewarovej nádoby. V tekutom dusíku boli vzorky ponechané až do prípravy vzoriek na mikroskopovanie.

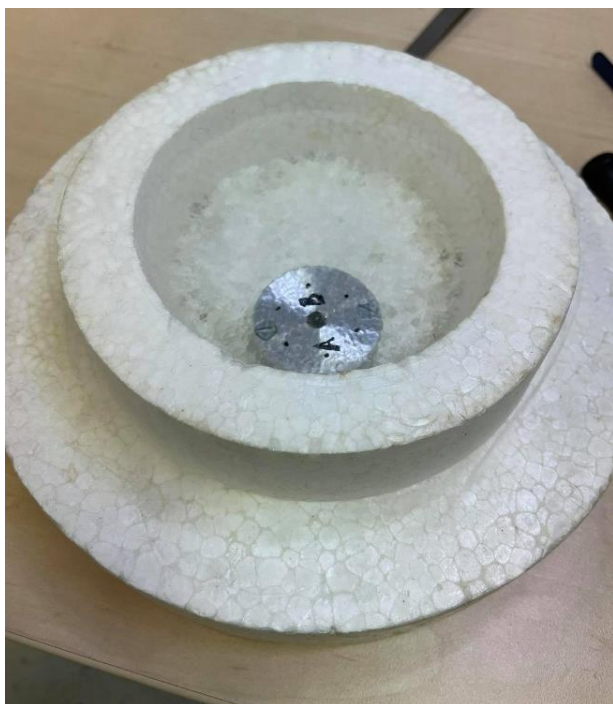
### **3.5.2 Analýza vzoriek pomocou kryo-SEM**

Pred analýzou vzoriek pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu s kryo-systémom bol uskutočnený u vzoriek freeze-fracturing (mrazové lámanie) a freeze-etching (mrazové leptanie) v prostredí vákua a pri nízkej teplote (v prístroji ACE600). Sublimáciou sa odstráni vrstva ľadu

zo vzorky a bunky sú viditeľnejšie pri pozorovaní mikroskopom. Odhalenie vnútorného povrchu bunkových organel zabezpečí mrazové lámanie. Výhodou je, že pri tomto procese nedochádza k poškodeniu odhaľovaného povrchu.

### 3.5.2.1 Freeze-fracturing a freeze-etching

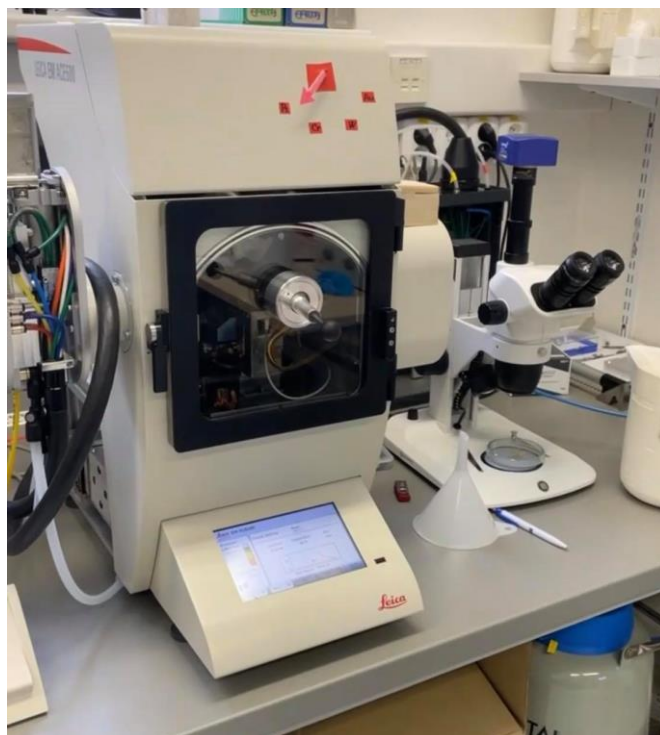
Zásobník so vzorkami bol prenesený z Dewarovej nádoby do vane s tekutým dusíkom, ktorá je zobrazená na obr. 13). Carriery s priemerom 6 mm boli zbavené vrchnej časti a upevnené do držiaka. V jednom držiaku mohli byť umiestnené maximálne dve vzorky. Vzorka musí byť neustále v prostredí tekutého dusíka, a preto bol držiak so vzorkami prenášaný do loading station (upínacej stanice) v nádobke s tekutým dusíkom. Držiak bol upevnený v loading station (viď obr. 14) a prikrytý medeným krytom. Pripojením shuttle (transferu) bol držiak so vzorkami prenesený do kryo-prípravnej komory (teplota  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ACE600 uvedenej na obr. 15. Vzorky boli poškriabané (freeze-fracturing) pomocou noža/sklapelu. Sublimácia (freeze-etching) bola uskutočnená pri  $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minút (viď obr. 16) pri vzorkách G a E. Čas bol však pri ostatných vzorkách upravený na 7 minút. Kvôli nevyhovujúcim snímkam z mikroskopu (zvolený krátky čas sublimácie - 5 minút) bola vzorka E bola pripravovaná opätovne na mikroskopovanie a sublimovaná v prístroji ACE600 po dobu 7 minút. Po ukončení sublimácie bolo vnútro shuttle vychladené tekutým dusíkom a držiak so vzorkami bol prenesený rýchlo do skenovacieho elektrónového mikroskopu s kryo-systémom.



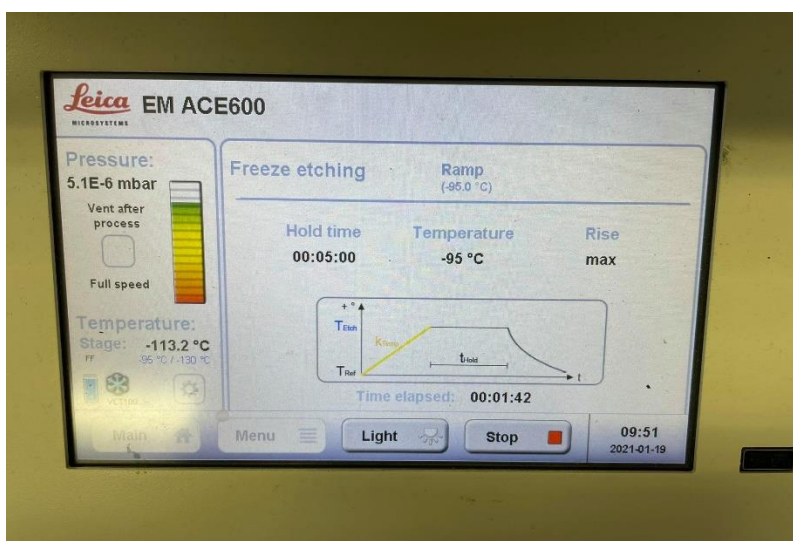
Obr. 13 Zásobník so vzorkami v tekutom dusíku



Obr. 14 Držiak so vzorkami v loading station,  
(biela šípka ukazuje na držiak)



*Obr. 15 Kryo-prípravná vákuová komora ACE600*



*Obr. 16 Priebeh sublimácie v kryo-prípravnej komore ACE600*

### **3.5.2.2 Mikroskopovanie vzoriek bez pokovovania**

Vzorky boli pozorované pomocou skenovacieho mikroskopu s kryo-systémom, ktorý využíva ETD (Everhart-Thornley) detektor zachytávajúci sekundárne elektróny. Najskôr bol vycentrovaný zväzok elektrónov a obraz doostrený pomocou posunu osí stigmátorov, Napätie bolo nastavené na 1 kV, prúd elektrónového lúča na 6,3 pA a pracovná vzdialenosť na približne 4 mm. Frame integration (integrácia obrazu) bola nastavená na hodnotu 60. Časť vzorky bola skenovaná viackrát, aby sa zamedzilo deštrukcii vzorky dlhým ožarovaním elektrónovým lúčom. Najskôr bola vzorka zmapovaná (odfotená) pri menšom zväčšení. Zaujímavé časti

vzorky (bunky s PHA) boli približené a odфотографované pri zväčšení max. 15 000 – násobnom. Veľké zväčšenie spôsobuje lokálne nabíjanie vzoriek, keďže dochádza k ožiareniu malej plochy nevodivej vzorky. Vznikajú tak artefakty (výsledný snímok je rozmazaný po okrajoch). Pomocou mikroskopu boli pozorované len maximálne 2 vzorky, ktoré boli umiestnené v držiaku.

Taktiež bol skúmaný vplyv dodatočnej sublimácie v mikroskope na všetky vzorky (okrem vzorky G – postačovala sublimácia v prístroji ACE600). Sublimácia bola realizovaná pri rovnakej teplote ako sublimácia v prístroji ACE600 (–95 °C) po dobu 7 minút (pre vzorky D a F) alebo 2 minúty (pre vzorky A, B, C a E). Po ochladení vzoriek na pôvodnú teplotu v mikroskope (–120 °C) boli vzorky opäť pozorované a snímané pomocou mikroskopu.

### 3.5.2.3 Mikroskopovanie vzoriek po pokovovaní platinou

Niektoré vzorky (D a F) boli po nasnímaní pomocou mikroskopu prenesené do prístroja ACE600, kde boli pokovované 2,75 nm vrstvou platiny. Po premiestnení vzoriek naspäť do mikroskopu bolo upravené napätie na 3 kV a prúd elektrónového lúča na 13 pA. Taktiež bol pri realizácii niektorých fotografií nastavený aj immerzný mód. Pri tomto móde bol využitý TLD (through the lens detector). Snímky vzoriek boli porovnávané so snímkami vzoriek bez pokovovania.

### 3.5.3 Príprava vzoriek na analýzu pomocou TEM

Pred analýzou pomocou TEM, museli byť vzorky upravené do podoby vhodnej k vytvoreniu tenkých rezov vzoriek. V procese mrazovej substitúcie bola nahrádzaná voda vo vzorke organickým rozpúšťadlom, aby sa zabránilo kryštalizácii. V druhom kroku boli vzorky zalievané do epoxidovej živice kvôli odstráneniu zvyškov organického rozpúšťadla a fixácii (vytvrdeniu) vzorky.

#### 3.5.3.1 Mrazová substitúcia

Bol pripravený 1,5% roztok oxidu osmičelého v acetóne. Substitučný roztok bol rozpipetovaný do pripravených vialiek, ktoré boli následne presunuté do substitučnej jednotky EM AFS2. Jednotka bola vychladená pomocou tekutého dusíka na –90 °C (viď obr. 17). Zásobník so vzorkami bol prenesený z Dewarovej nádoby do vane s tekutým dusíkom. Vzorka musí byť neustále v prostredí tekutého dusíka a preto boli 3 mm carryery prenášané v nádobke s tekutým dusíkom a premiestnené do určených vialiek. Substitučný proces bol v jednotke spustený a prebiehal podľa zvoleného substitučného protokolu uvedeného v tab. 7.

Tab. 7 Substitučný protokol pre mrazovú substitúciu v substitučnej jednotke EM AFS2

Fáza substitúcie	Teplota [°C]	Prírastok [°C/h.]	Čas [min]
1.	–90	0	72
2.	–20	5	14
3.	–20	0	24
4.	4	3	8
5.	4	0	18





*Obr. 17 Proces chladenia substitučnej jednotky EM AFS2 tekutým dusíkom*

### **3.5.3.2 Zalievanie vzoriek do epoxidovej živice**

Na prípravu epoxidovej živice strednej tvrdosti bol použitý Epoxy Embedding Medium kit. Tento kit obsahoval zložky uvedené v tab. 8. Množstvá prvých 3 zložiek uvedené taktiež v tabuľke boli zmiešané. Nakoniec bolo pridaných 0,7 ml urýchľovača a opäť bolo všetko poriadne premiešané.

Po ukončení procesu mrazovej substitúcie boli vzorky premyté acetónom. Po 15. minútach bol proces opakovaný. Vzorky boli celkovo premyté acetónom trikrát. Roztoky epoxidovej živice v acetóne boli pripravené v pomeroch 1:2, 1:1 a 2:1. Postupne boli pipetované roztoky k vzorkám od najnižšej koncentrácie živice v acetóne po najvyššiu (čistá živica). Výmena roztokov bola uskutočnená po 1 hodine. Živica bola vo vialkách so vzorkami vymenená za novú a vzorky boli umiestnené do exikátora, ktorý bol pripojený na vývevu pre vytvorenie podtlaku. V exikátore boli vzorky ponechané do druhého dňa. Živica bola odpipetovaná z vialiek so vzorkami a vzorky boli premiestnené do BEEM kapsúl. (použitý typ kapsule na obr. 18 vľavo). Vzorky boli odstredené 4 minúty pri 4 000 rpm. Živica bola odpipetovaná z BEEM kapslí so vzorkami a vymenená za novú. Vzorky boli vložené do termostatu nastaveného na 60 °C a ponechané v ňom po dobu 48 hodín.

*Tab. 8 Zložky Epoxy Embedding Medium kitu a ich množstvo použité na prípravu živice*

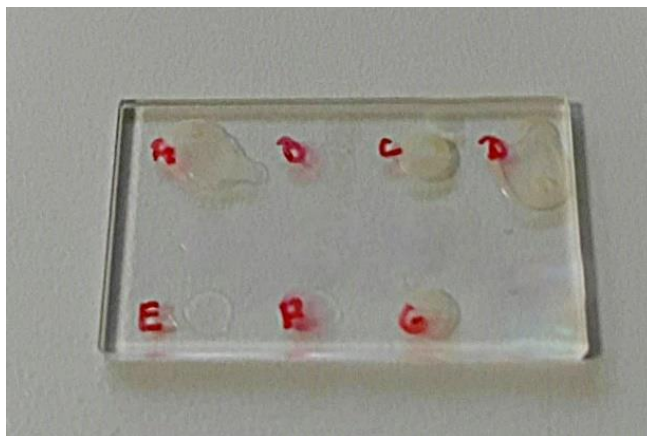
<b>Zložka Epoxy Embedding Medium kitu</b>	<b>Množstvo použité na prípravu živice [ml]</b>
Epoxidové zalievacie médium (Epon 812 substituovaný)	20
Vytvrdzovač MNA (anhydrid kyseliny 1,2,3,6- tetrahydrometyl-3,6-methanoftalovej)	12
Vytvrdzovač DDSA (anhydrid kyseliny 1-dodecenyljantárovej)	9
Urýchľovač DMP 30 (2,4,6-Tris(dimetylaminometyl)fenol)	0,7



*Obr. 18 Rôzne druhy BEEM kapsulí používané pri príprave vzoriek na TEM*

### **3.6 Analýza vzoriek pomocou Ramanovej mikrospektroskopie**

Z každej banky so suspenziou po kultivácii bol realizovaný odber po 10 ml do skúmaviek, ktoré boli uchované pri teplote  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v hlboko-mraziacom boxe až do ich analýzy pomocou Ramanovej mikrospektroskopie. Po rozmrazení boli vzorky odstreďované 4 minúty na centrifúge pri otáčkach 4 000 rpm. Na mikroskopické sklíčko z fluoridu vápenatého (Raman grade, Crystran, UK) boli nakvapkané vzorky a po uschnutí boli vzorky nanosené opakovane kvôli dosiahnutí lepšej koncentrácie. Sklíčko s vyschnutými vzorkami (viď obr. 19) bolo umiestnené do Ramanovho mikroskopu zobrazeného na obr. 20. Ramanove spektrá boli snímané pomocou mikroskopu v rozsahu  $700\text{--}18\,00\text{ cm}^{-1}$ . Meranie bolo realizované pri každej vzorke pätnásťkrát z rôzneho miesta kvôli štatistickej váhe výsledkov. Pri meraní bol použitý objektív s 50-násobným zväčšením a NA 0,5 (numerical aperture – numerická clona) a ako detektor CCD (charge-coupled device). Vzorky boli ožiarené laserom s vlnovou dĺžkou 785 nm, ktorý bol fokusovaný na povrch kvapky vzorky. Bol zvolený 100% výkon laseru, ktorý odpovedá 140 mW. Počet akumulácii zo snímaného miesta bol nastavený na 60 a spektrá boli zbierané po dobu 1 s.



*Obr. 19 Vzorky suspenzie po kultivácii nanosené na mikroskopickom sklíčku z fluoridu vápenatého*





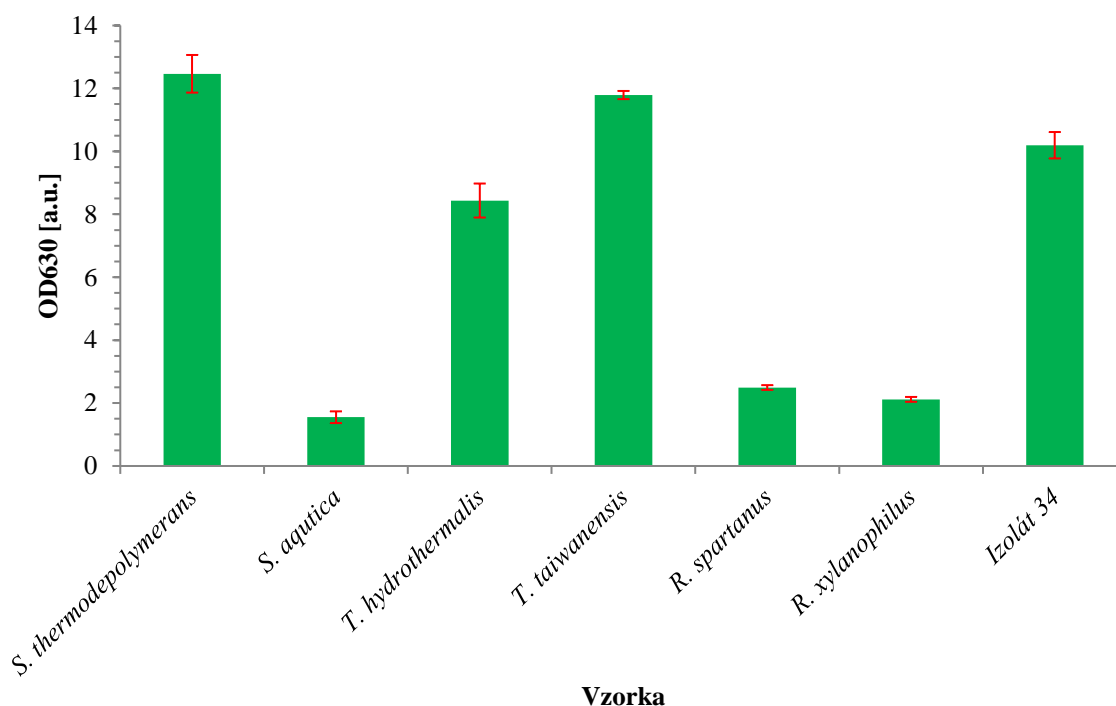
*Obr. 20 Ramanov mikroskop, RENISHAW inVia*

Namerané Ramanove spektrá boli spracovávané v softvéri vytvorenom v prostredí MATLAB, ktorý bol naprogramovaný podľa požiadaviek merného strediska. Na odstránenie šumu pozadia, ktorý je spôsobený nežiadúcou fluorescenciou bol použitý filtrovací algoritmus Rolling circle (použité nastavenie: radius 300, passes 90). Spektrum bolo vyhladené použitím Savitzky-Golay procedúry (použité nastavenie: SG order 2, SG frame 7). Bola uskutočnená analýza hlavných komponent (PCA), aby mohlo byť spektrum normalizované k určitému píku, ktorého intenzita je v rámci vzoriek približne rovnaká. Pre vytvorenie kalibračnej krivky popisujúcej závislosť obsahu PHB na relatívnej Ramanovej intenzite bola uskutočnená normalizácia spektier k píku amidu I ( $1658\text{ cm}^{-1}$ ), ktorý charakterizuje sekundárnu štruktúru proteínov.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Spektrofotometrické stanovenie optickej hustoty

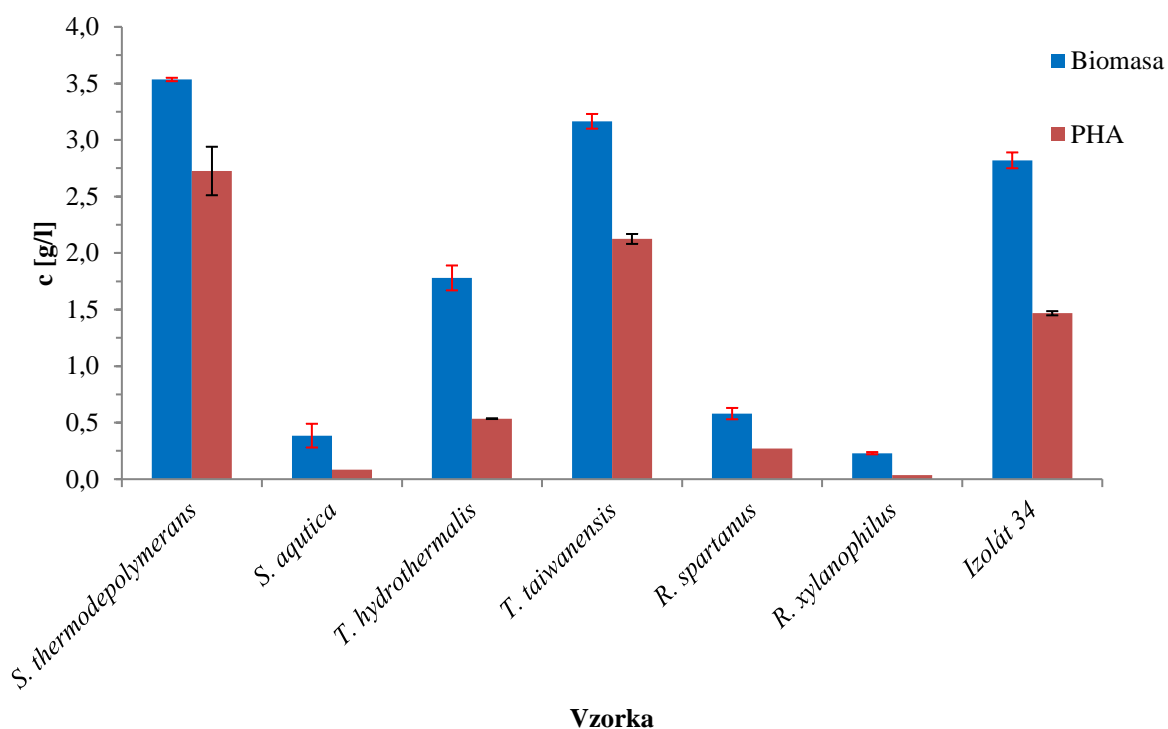
Optická hustota vzoriek bola nameraná spektrofotometricky pri 630 nm (viď obr. 21). Chybové úsečky reprezentujú v oboch smeroch štandardnú odchýlku vypočítanú z troch meraní uskutočnených pre každú vzorku. Najvyššia zistená optická hustota bola u vzorky s baktériou *Schlegelella thermodepolymerans* ( $12,47 \pm 0,60$ ). Najnižší zákal bol pozorovaný u vzorky s baktériou *Schlegelella aquatica*, čo potvrdila aj najnižšia nameraná hodnota optickej hustoty pomocou spektrofotometra ( $1,55 \pm 0,19$ ). Nízka hodnota optickej hustoty ( $2,12 \pm 0,08$ ) bola nameraná aj u vzorky s baktériou *Rubrobacter xylanophilus*.



Obr. 21 Optická hustota nameraná u vzoriek pri 630 nm

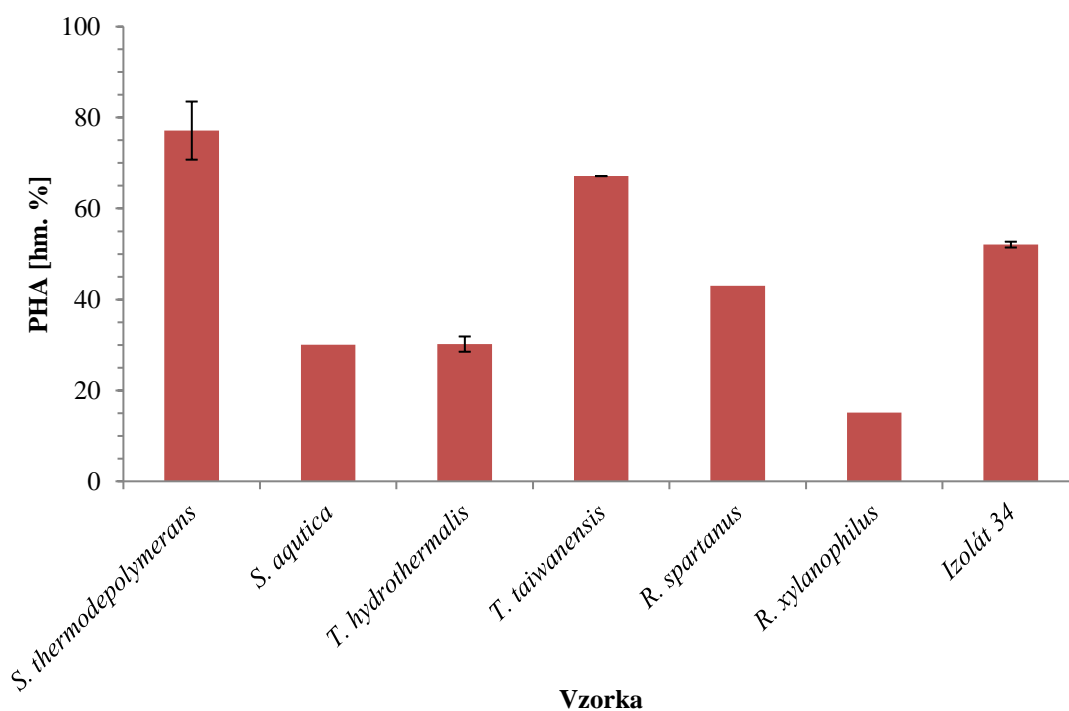
### 4.2 Analýza vzoriek pomocou plynovej chromatografie

Výsledky analýzy jednotlivých vzoriek baktérií pomocou plynovej chromatografie sú graficky zobrazené na obr. 22. Graf udáva množstvo biomasy a PHA v g/l dosiahnuté u jednotlivých vzoriek. Obsah PHA v hm. % nameraný u jednotlivých vzoriek baktérií je znázornený na obr. 23. Chybové úsečky reprezentujú v oboch smeroch štandardnú odchýlku vypočítanú z dvoch meraní uskutočnených pre každú vzorku. Pri vzorkách s baktériami *Schlegelella Aquatica*, *Rubrobacter spartanus* a *Rubrobacter xylanophilus* bola koncentrácia biomasy v g/l tak nízka, že nemohlo byť uskutočnené paralelné stanovenie obsahu PHA pomocou plynovej chromatografie. Pri týchto vzorkách sa preto v tabuľke pri nameraných PHA neuvádza štandardná odchýlka. Z nameraných hodnôt vyplýva, že najvyššia koncentrácia biomasy bola dosiahnutá u vzorky s baktériou *Schlegelella thermodepolymerans* a to až  $3,54 \pm 0,02$  g/l. Najnižšia koncentrácia biomasy bola nameraná u vzorky s baktériou *Rubrobacter xylanophilus* ( $0,23 \pm 0,01$  g/l).



Obr. 22 Namerané množstvo biomasy a PHA v g/l u jednotlivých vzoriek baktérií

Vzorka s baktériou *Schlegelella thermodepolymerans* sa vyznačovala nielen najvyššou koncentráciou biomasy, ale aj najvyšším obsahom PHA ( $77,13 \pm 6,39$  hm. %). Najnižší obsah PHA bol nameraný pri vzorke s baktériou *Rubrobacter xylanophilus* (len 15,15 hm. %).



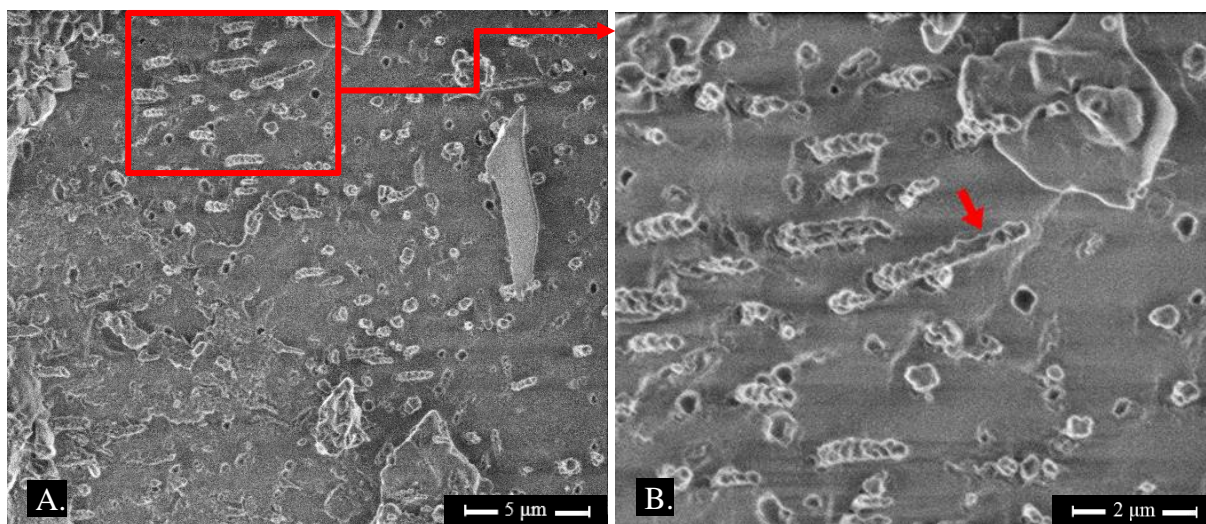
Obr. 23 Nameraný obsah PHA v hm. % u jednotlivých vzoriek baktérií

## 4.3 Analýza vzoriek pomocou kryo-SEM

### 4.3.1 Mikroskopovanie vzoriek bez pokovovania

Z vyhotovených fotografií vzoriek baktérií pomocou kryo-skenovacieho elektrónového mikroskopu boli pre každú vzorku vybrané 2 fotografie. Fotografia na ľavej strane v dokumente (označená A.) bola nasnímaná pri menšom zväčšení a zobrazuje väčšiu časť vzorky. Z tejto fotografie bola zvolená časť vzorky, ktorá bola odфотографovaná pri väčšom zväčšení (zobrazuje ju fotografia na pravej strane dokumentu označená ako B.). Fotografie boli nasnímané pri napätí 1 kV a prúde elektrónového lúča 6,3 pA. Mierka zväčšenia je na každej fotografii uvedená v pravom dolnom rohu. Výsledkom analýzy pomocou kryo-SEM je charakterizácia jednotlivých buniek a PHB, ktoré bunky obsahovali a taktiež zhodnotenie podmienok analýzy na celkové nasnímané fotografie. U všetkých baktérií bola teda potvrdená produkcia PHA.

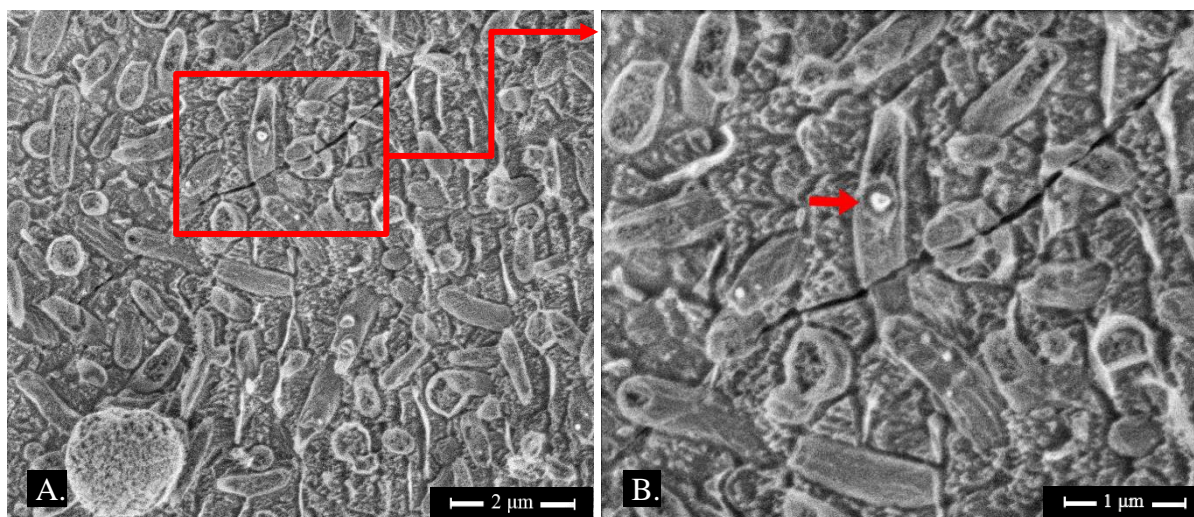
Na obr. 24 vzorky A (*Schlegelella thermodepolymerans*) nie je dostatočne vidieť bakteriálne bunky. Predpokladá sa, že je to spôsobené nedostatočnou sublimáciou. Nie je možné teda posúdiť, či sa tvar, dĺžka a šírka bakteriálnych buniek zhoduje s literatúrou. PHB granule sú však dostatočne viditeľné a možno pozorovať u väčšiny plastickú deformáciu ihlicovitého tvaru. Tento jav je popisovaný v literatúre a predstavuje dôkaz zachovania vysokej flexibility týchto amorfných intracelulárnych granúl aj pri veľmi nízkych teplotách. K tvorbe týchto deformácií PHB granúl dochádza pri mrazovom lámaní vzorky. PHB granule majú odlišné mechanické vlastnosti ako iné bunkové komponenty a ich vysoká flexibilita môže napríklad pomôcť bakteriálnym bunkám zniesť šmykové napätie, ktoré je spôsobené ľadovými kryštálmi počas mrazenia vzorky [37]. Izoláciou PHB granúl z bakteriálnych buniek dochádza k ich kryštalizácii a následne sa zredukuje ich flexibilita. Predĺženie v ťahu je následkom toho nižšie ako pri natívnych amorfných PHB granulách [36]. Z fotografií je možné usúdiť, že najväčší obsah PHB akumulujú tieto baktérie. Tento predpoklad bol potvrdený aj výsledkami z plynovej chromatografie a Ramanovej mikrospektroskopie (viď kapitoly 4.2 a 4.5).



Obr. 24 Kryo-SEM fotografie vzorky A (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

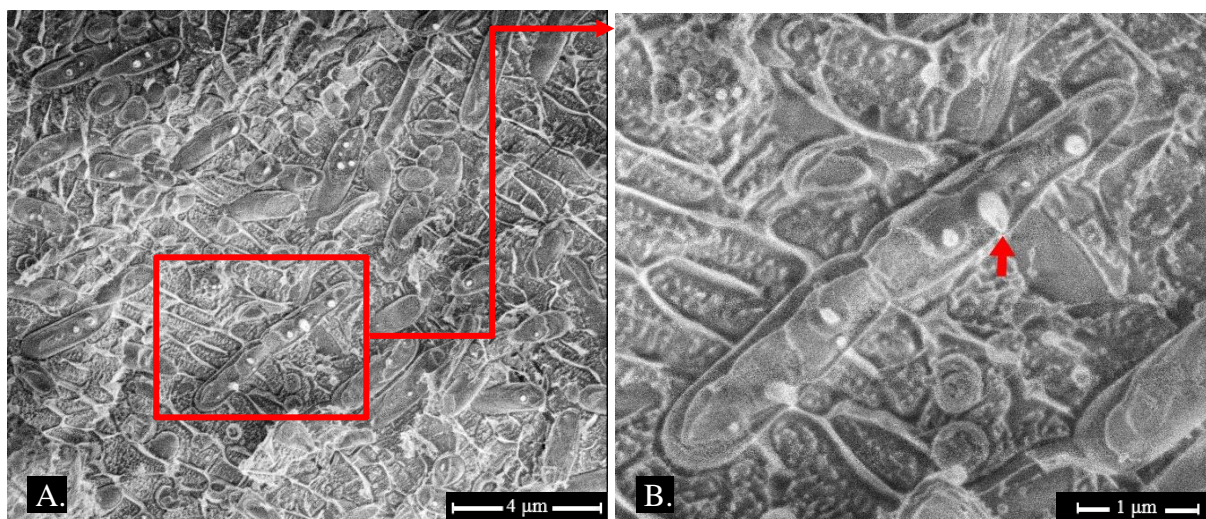


Obr. 25 vzorky B (*Schlegelella aquatica*) znázorňujú bakteriálne bunky tyčinkovitého tvaru, ktorý je pre rod *Schlegelella* charakteristický. Bunky dosahujú dĺžku do približne 1,5  $\mu\text{m}$  a priemer okolo 0,5  $\mu\text{m}$ . Veľkosti buniek sa zhodujú s literatúrou. Pri väčšom zväčšení (obrázok B.) bola odфотографovaná bunka, ktorá bola rozseknutá na polovicu. V tomto mieste bol poškriabaný povrch vzorky pri mrazovom lámaní. Z fotografie je možno vidieť, že tieto baktérie produkujú malé množstvo PHB. Väčšina bakteriálnych buniek vôbec neobsahovala granule. Výsledky z plynovej chromatografie a Ramanovej mikrospektroskopie potvrdzujú tento predpoklad (viď kapitoly 4.2 a 4.5).



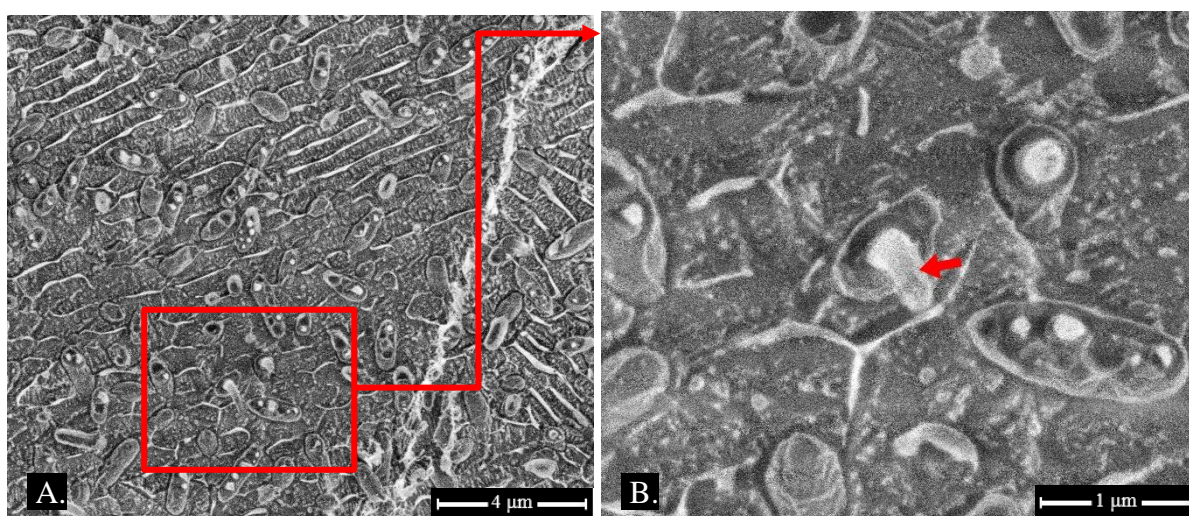
Obr. 25 Kryo-SEM fotografie vzorky B (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

Fotografie vzorky C (*Thermomonas hydrothermalis*) zobrazuje obr. 26. U bakteriálnych buniek bol potvrdený literatúrou popisovaný tyčinkovitý tvar, šírka bunky dosahujúca takmer 1  $\mu\text{m}$  a dĺžka bunky v rozmedzí približne 2 - 4  $\mu\text{m}$ . Pri väčšom zväčšení (obrázok B.) bola odфотографovaná deliaca sa bunka s viac malými PHB granulami. U oboch buniek je viditeľná bunková stena a cytoplazmatická membrána okolo bunky. Na tomto obrázku možno pozorovať aj plastickú deformáciu PHB granúl. Predĺženie granúl však nie je tak veľké ako na obrázkoch vzorky A alebo D. Z fotografií tejto vzorky bolo tiež zistené, že väčšina bakteriálnych buniek obsahovala viac menších PHB granúl.



Obr. 26 Kryo-SEM fotografie vzorky C (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

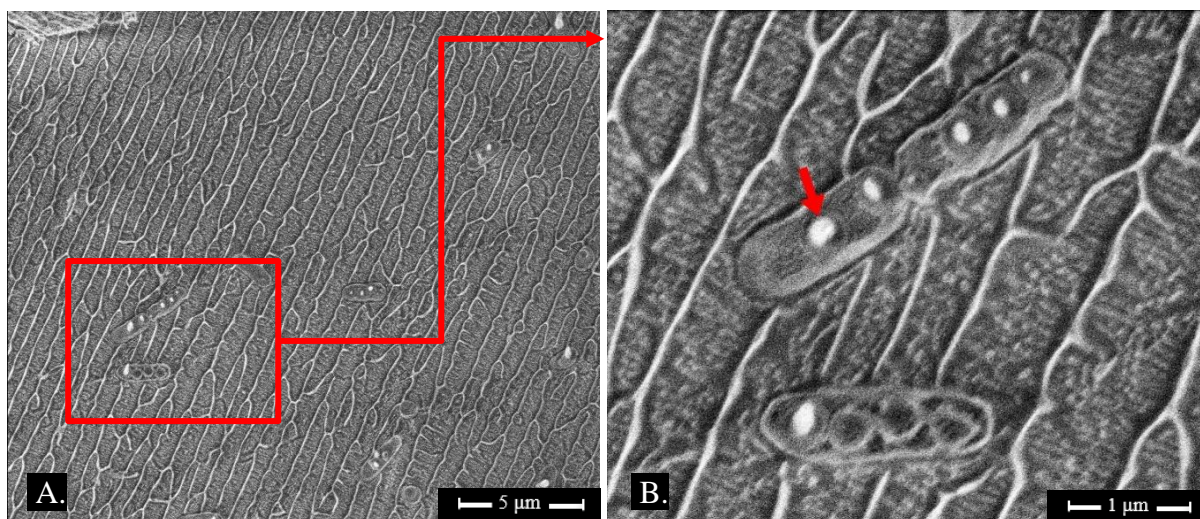
Podľa obr. 27 sú bunky baktérie *Tepidomas taiwanensis* (vzorka D) menšie (dĺžka približne 1,5 µm a priemer okolo 0,5 µm) a prevažne tyčinkovitého tvaru. Väčšina z nich obsahuje viac malých PHB granúl. Fotografia vľavo (A.) pri menšom zväčšení ukazuje aj rez cez povrch vzorky spôsobený mrazovým lámaním. Na snímke vpravo (B.) možno pozorovať aj plastickú deformáciu PHB granle.



Obr. 27 Kryo-SEM fotografie vzorky D (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

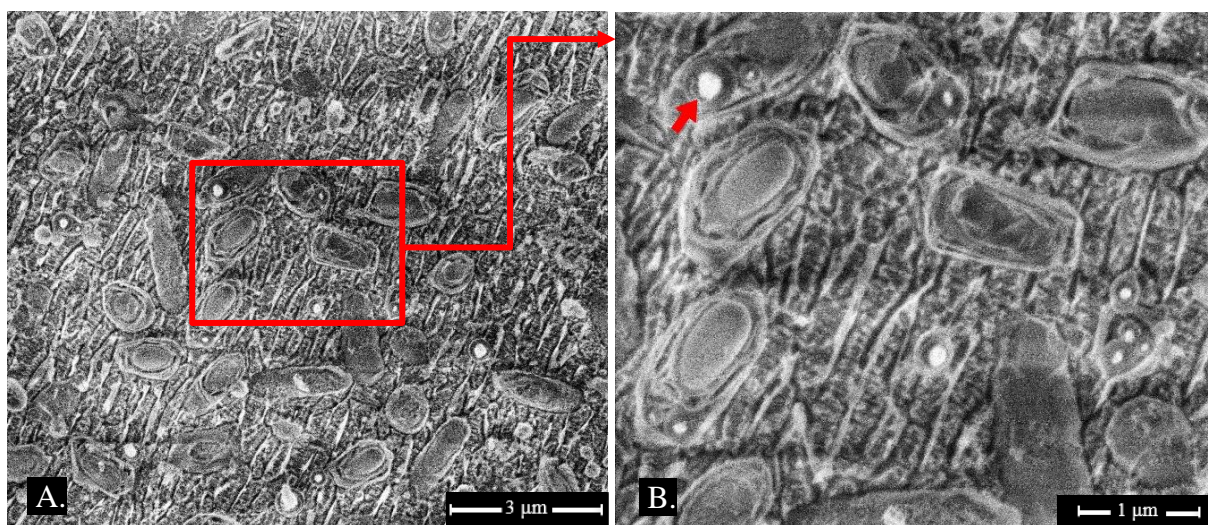
Z fotografie vzorky E (baktéria *Rubrobacter spartanus*, obr. 28) na ľavej strane (A.) je možné vidieť veľmi malé množstvo bakteriálnych buniek. Prevažne v každej sa však nachádzajú PHB granule. Nepravidelný tyčinkovitý tvar buniek je zhodný s literatúrou, avšak bunky sú dlhšie (dosahujú aj 1,5 µm, uvádzaná dĺžka je 1 µm). Na obrázku vpravo (B.) sú zachytené 2 bunky s PHB granulami. Taktiež táto snímka ukazuje, že v bunke baktérie sa nachádzali tri diery (miesta) po vypadnutí PHB granúl.





Obr. 28 Kryo-SEM fotografie vzorky E (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

Vzorka F (*Rubrobacter xylanophilus*) obsahuje veľké množstvo bakteriálnych buniek (viď obr. 29). V literatúre sú bunky popisované ako veľmi krátke, tyčinkovitého tvaru (prípadne sférický tvar u starších kultúr na pevnom médiu). Z uvedených obrázkov je tyčinkovitý tvar (prípadne sférický) pozorovateľný u niektorých buniek. Z uvedených fotografií vzorky F je viditeľné, že množstvo PHB je v bunkách baktérií malé, čo sa zhoduje s výsledkami z plynovej chromatografie a Ramanovej mikrospektroskopie (viď kapitoly 4.2 a 4.5).

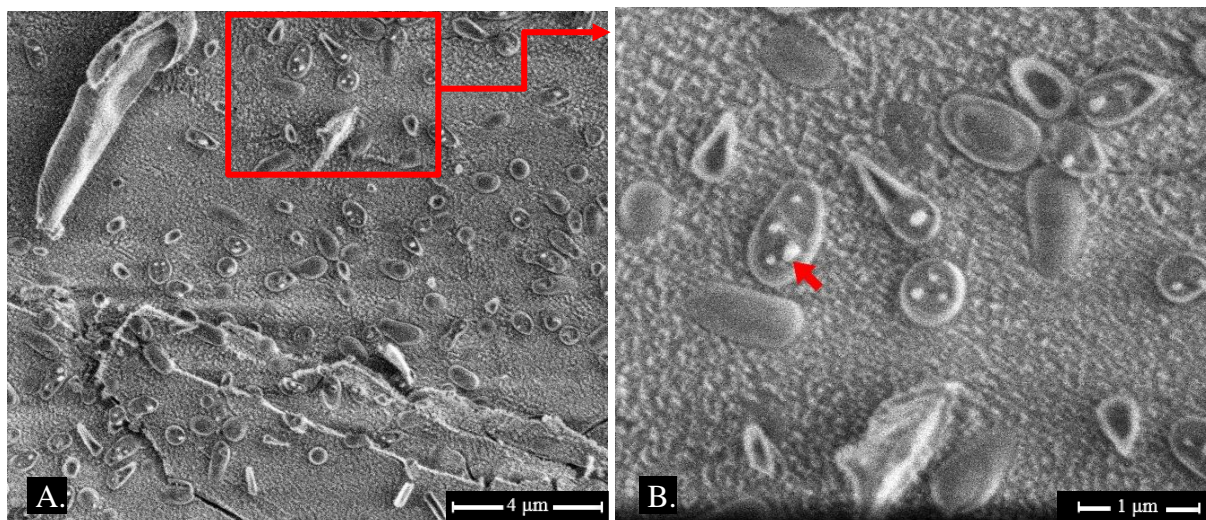


Obr. 29 Kryo-SEM fotografie vzorky F (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

Bunky izolátu 34 (vzorka G) sú znázornené na obr. 30. V porovnaní s ostatnými vzorkami sú bakteriálne bunky tejto vzorky menšie. Rozmerovo sú menšie aj pri porovnaní s údajmi uvádzanými v literatúre (dosahujú dĺžku max. 1 µm a maximálnu šírku približne 0,75 µm). Charakteristický tyčinkovitý tvar bakteriálnych buniek je viditeľný len u niektorých buniek. Väčšina buniek je prevažne sférického tvaru. Bakteriálne bunky obsahujú viacero malých PHB granúl. Aj keď bol zvolený kratší čas sublimácie vzorky v prístroji ACE600 ako



pri ostatných vzorkách a v mikroskope nebola sublimácia vôbec uskutočnená, bunky sú dostatočne viditeľné. Na obrázku vpravo (B.) je vidieť lokálne nabíjanie vzorky – rozmazanie obrazu na okraji. Dochádza k tomu pri použití veľkého zväčšenia mikroskopu, keď prúd elektrónového lúča dopadá na veľmi malú plochu vzorky, ktorá je nevodivá.



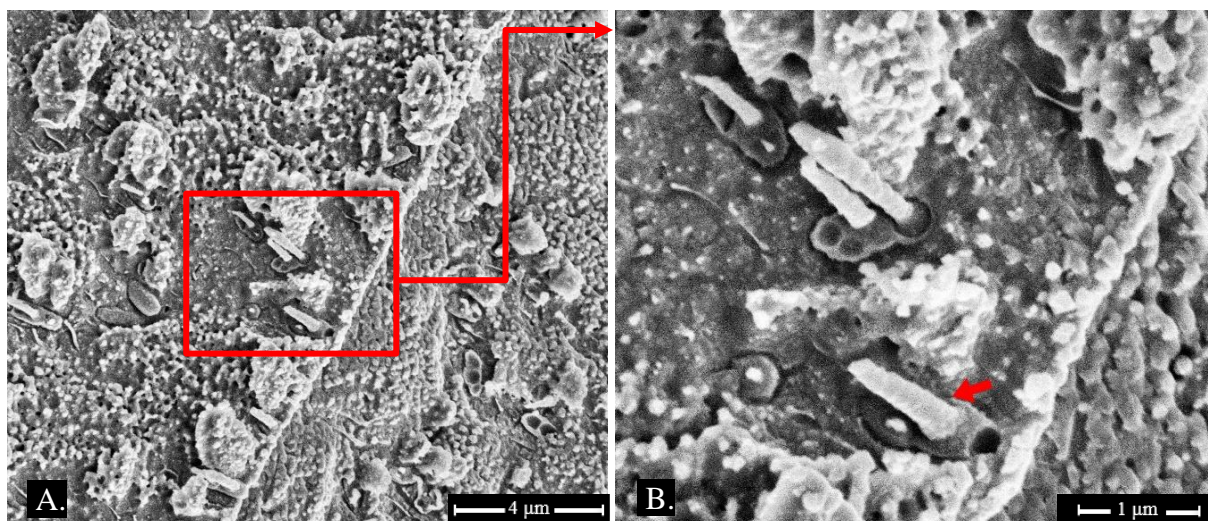
Obr. 30 Kryo-SEM fotografie vzorky G (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)

#### 4.3.2 Mikroskopovanie vzoriek po pokovovaní platinou

Vzorky D a F boli pokovované 2,75 nm vrstvou platiny. Fotografie boli nasnímané pri napätí 3 kV a prúde elektrónového lúča 13 pA. Mierka zväčšenia je na každej fotografii uvedená v pravom dolnom rohu. Nanosením vrstvy kovu na povrch vzoriek sa dosiahla jej väčšia vodivosť a preto mohol byť pri mikroskopovaní použitý väčší prúd a/alebo napätie. Dosiahlo sa tým ostrejšieho obrazu s viac detailmi bez veľkého nabíjania a bunkové štruktúry sú na fotografiách lepšie identifikovateľné.

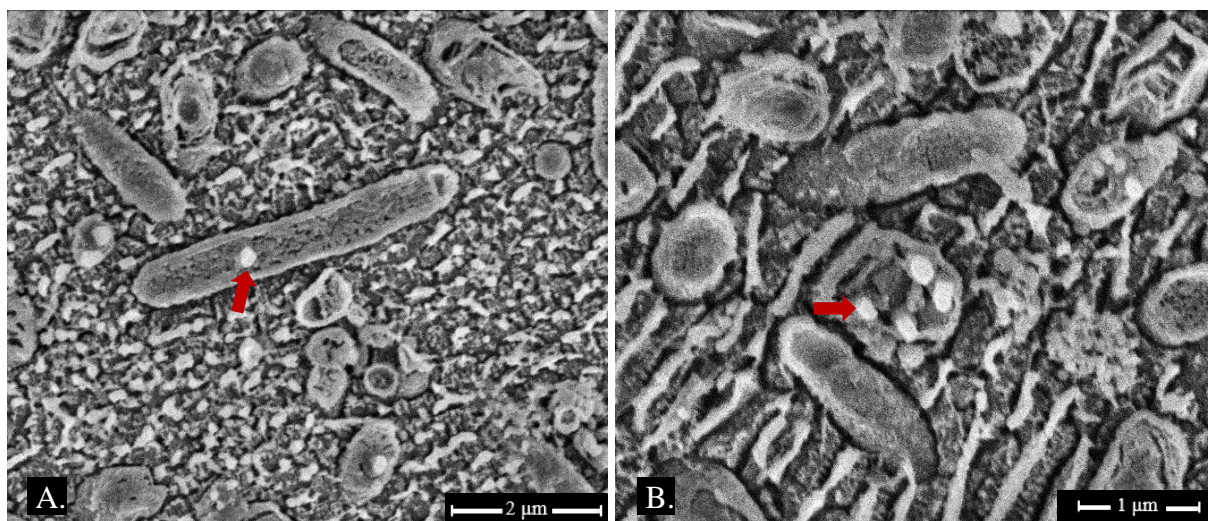
Obr. 31 ukazuje, že po pokovovaní vzorky D platinou boli PHB akumulované v bakteriálnych bunkách viditeľnejšie ako pri nepokovovanej vzorke. Taktiež plastická deformácia je lepšie pozorovateľná u väčšiny PHB granúl (vid' fotografia vpravo – B.). Ako bolo uvedené v kapitole 4.3.1 (odsek popisujúci vzorku D), bakteriálne bunky vzorky D sú menšie a obsahujú viac PHB granúl. Na fotografii na ľavej strane (A.) je vidieť rez cez povrch vzorky spôsobený mrazovým lámaním. Väčšina buniek sa nachádza práve blízko lomu, keďže po narušení povrchu vzorky dochádza k uvoľneniu buniek.





*Obr. 31 Kryo-SEM fotografie vzorky D po pokovovaní (červená šípka na pravej fotografii ukazuje na PHB granulu)*

Fotografie vzorky F po pokovovaní platinou (obr. 32) ukazujú, že bunková stena pozorovanej baktérie je podstatne hrubšia ako pri vzorke D. Vrstva kovu spôsobila jej zvýraznenie. Granule PHB sú však viditeľné približne rovnako pri vzorke bez pokovovania. Tyčinkový (prípadne sférický) tvar buniek je zhodný s uvedeným tvarom v literatúre. Snímky potvrdzujú, že v bunkách baktérií je obsiahnuté veľmi malé množstvo PHB, čo je popisované aj v kapitole 4.3.1 (odsek popisujúci vzorku F).

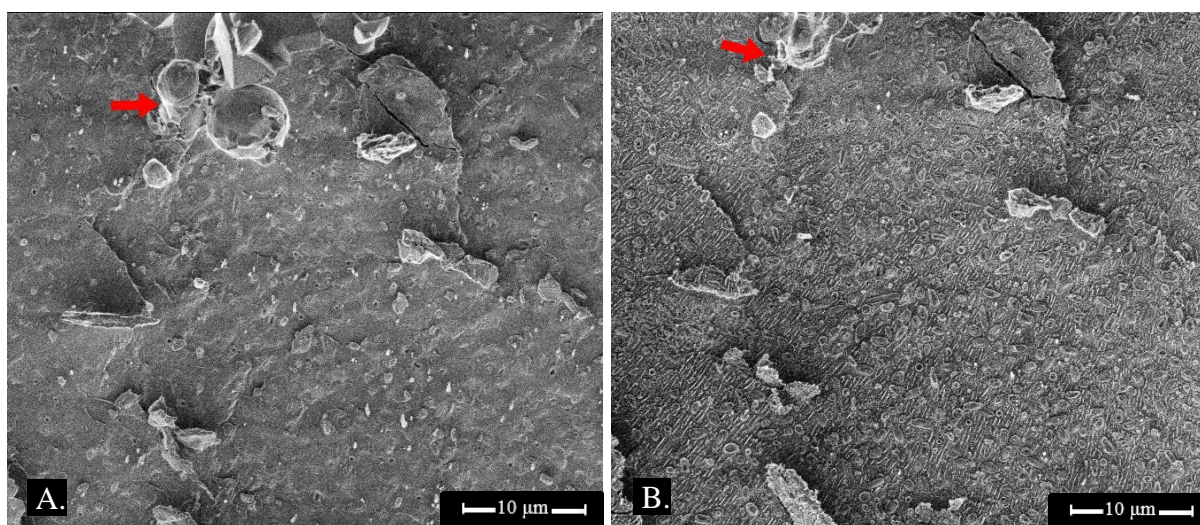


*Obr. 32 Kryo-SEM fotografie vzorky F po pokovovaní (červená šípka na fotografiách ukazuje na PHB granulu)*



#### 4.3.3 Mikroskopovanie vzoriek po nadmernej sublimácii v mikroskope

Pri vzorke F bola uskutočnená taktiež sublimácia v mikroskope, pri ktorej bol zvolený veľmi dlhý sublimačný čas. Fotografie vzorky F boli nasnímané pri napätí 1 kV a prúde elektrónového lúča 6,3 pA. Mierka zväčšenia je na každej fotografii uvedená v pravom dolnom rohu. Približne to isté miesto vzorky F odфотографované pred (A.) a po (B.) sublimácii realizovanej v mikroskope ukazuje obr. 33. Keď porovnáme uvedené obrázky, viditeľné zmenšenie ľadových kryštálov na povrchu vzorky (obrázok A.) je dosiahnuté po sublimácii (obrázok B.). Na obrázku B. sú však znázornené aj vzniknuté artefakty v ľade, kde boli bunky zaliate. Vzorka bola podrobená nadmernej sublimácii a v okolí buniek bola poškodená extracelulárna hmota (kultivačné médium). Bol teda zvolený nevhodný sublimačný čas.



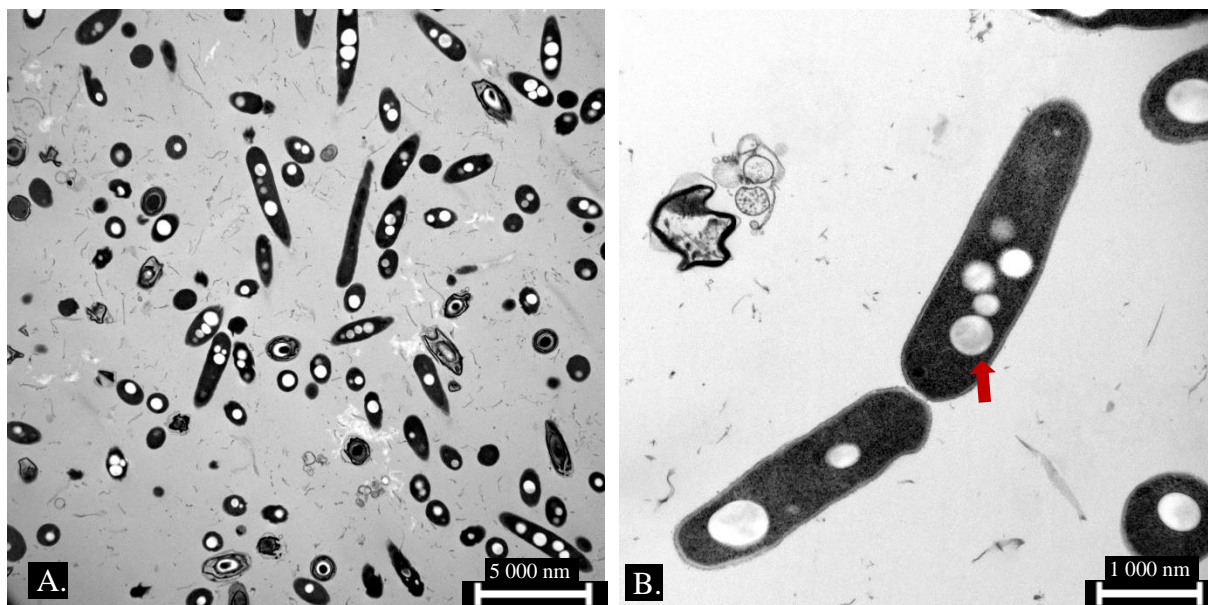
Obr. 33 Kryo-SEM fotografie vzorky F: A. pred a B. po sublimácii v mikroskope (červená šípka na fotografiách ukazuje na ľadové kryštály)

#### 4.4 Analýza vzoriek pomocou TEM

Zo vzoriek baktérií bola zvolená vzorka C (*Thermomonas hydrothermalis*), ktorá bola odфотографovaná pomocou transmisného elektrónového mikroskopu v Biologickom centre Akadémie Vied Českej republiky (Parazitologický ústav). Jednotlivé bunky tejto baktérie a intracelulárne PHB sú charakterizované pomocou uvedených fotografií, ktoré boli zo všetkých nasnímaných vybrané. Mierka zväčšenia je na každej fotografii uvedená v pravom dolnom rohu. Tieto fotografie sa v porovnaní s kryo-SEM snímkami vyznačujú lepším rozlíšením. Obrázky sú výrazne ostrejšie a celkovo sú bunky a PHB granule lepšie viditeľnejšie. Taktiež sú na väčšine fotografiách viditeľnejšie aj jemné detaily ako je bunková stena a cytoplazmatická membrána,

Na obr. 34 (A.) je viditeľné veľké množstvo bakteriálnych buniek. Takmer každá bunka obsahuje aspoň jednu PHB granulu. Fotografia zachytáva bakteriálne bunky obsahujúce viac malých PHB granúlí, čo je pre túto vzorku baktérie typické podľa nasnímaných fotografií. Na ľavej strane (A.) je uvedená fotografia, ktorá bola odфотографovaná pri menšom zväčšení a zobrazuje väčšiu časť vzorky. Z tejto snímky bola zvolená časť vzorky, ktorá bola priblížená (obrázok vpravo B). Tento obrázok znázorňuje 2 bunky pri ktorých je okolo nich viditeľná bunková stena a cytoplazmatická membrána. V závislosti na uskutočnenom reze cez

vzorku a zaliatí do živice vyzerajú byť niektoré bunky menšie. Sú však len rôzne priestorovo orientované. Ich popis z literatúry bol potvrdený rovnako ako pri analýze fotografií z kryo-SEM. Tvar bakteriálnych buniek je tyčinkovitý, šírka buniek dosahuje takmer  $1\ \mu\text{m}$  a ich dĺžka je v rozmedzí približne  $2 - 4\ \mu\text{m}$ . Obrázok na pravej strane (B.) Plastická deformácia PHB granúl nemôže byť pomocou TEM snímok potvrdená, pretože k nej dochádza pri mrazovom lámaní vzorky, ktoré sa uskutočňuje pred pozorovaním buniek pomocou kryo-SEM.



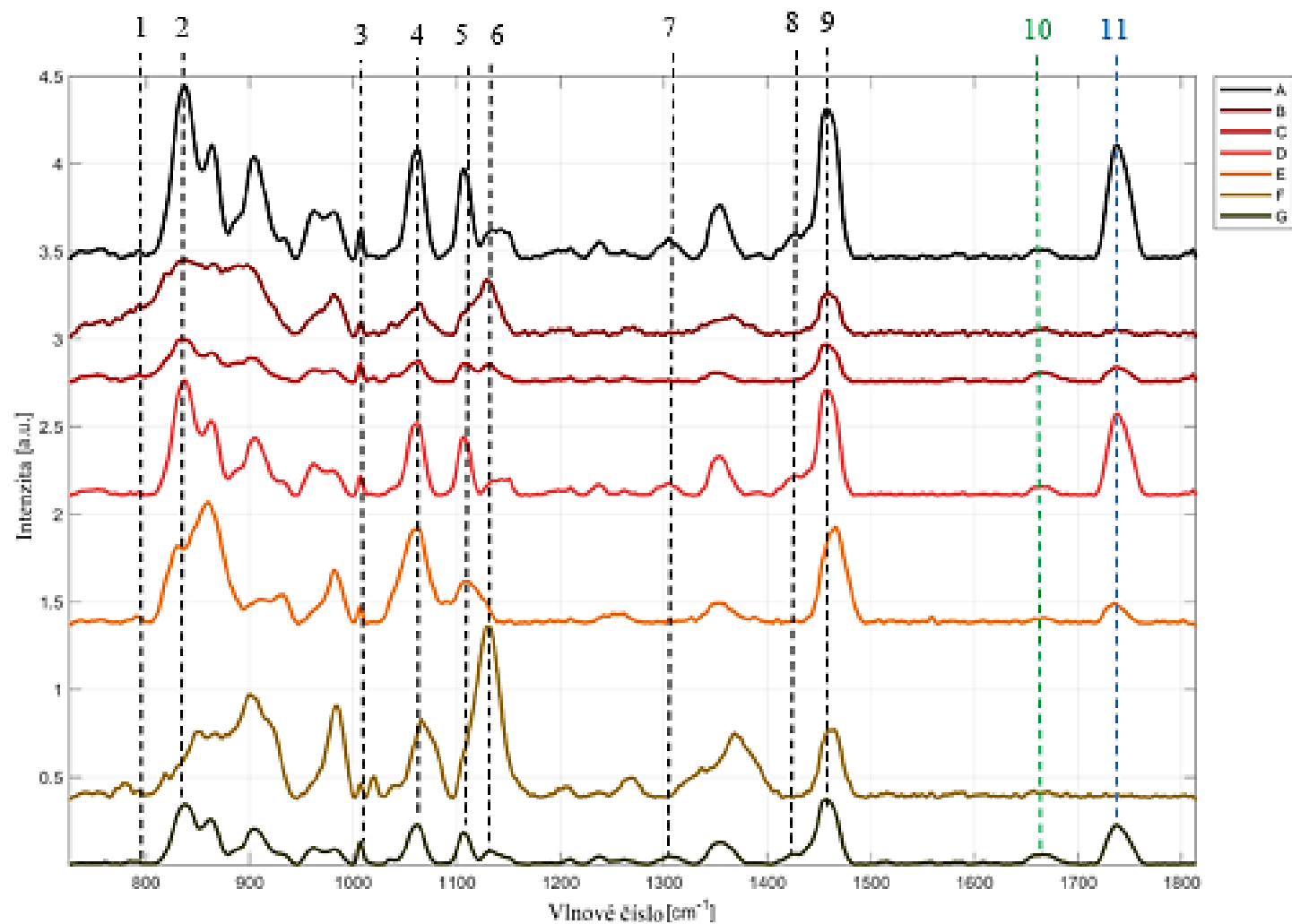
Obr. 34 TEM fotografie vzorky C (červená šípka na fotografiách ukazuje na PHB granulu)

#### 4.5 Analýza vzoriek pomocou Ramanovej mikrospektroskopie

Ramanove spektrum vyjadruje Ramanovu intenzitu voči vlnovému číslu. Nameraná hodnota intenzity je lineárne závislá na obsahu určitej látky vo vzorke. Vyššia hodnota intenzity vyjadruje, že došlo k Ramanovmu posunu pre väčšie množstvo fotónov počas zvoleného integračného času – 1 minúta. Porovnaním intenzít pri vlnovom čísle prislúchajúcom určitej väzbe, ktorá je charakteristická pre PHB, môže byť teda porovnaný obsah PHB v jednotlivých vzorkách.

Obr. 35 znázorňuje Ramanove spektrá namerané pre všetky vzorky a vyznačené píky, ktoré boli identifikované. Tab. 9 udáva označenie vzoriek a prislúchajúce bakteriálne kmene. Bunkové štruktúry/biochemické väzby identifikované v nameraných Ramanových spektrách bakteriálnych buniek s prislúchajúcimi vlnovými číslami sú uvedené v tab. 10. Tieto spektrá boli vytvorené z hodnôt Ramanových intenzít, ktoré sú priemerom pätnástich meraní realizovaných pre danú vzorku. V Ramanovom spektre všetkých vzoriek sa nachádzajú tri píky charakteristické pre PHB. Pre porovnanie obsahu PHB vo vzorkách a vytvorenie kalibračnej krivky bol zvolený len posledný pík (III) vyznačený v spektre modrou farbou s maximom Ramanovej intenzity pri  $1\ 736\ \text{cm}^{-1}$  (č. 11 na obr.). Hodnoty intenzít pri tomto vlnovom čísle nie sú ovplyvnené inou biomolekulou ako pri ostatných dvoch píkoch pre PHB. Prvý pík charakteristický pre PHB ( $838\ \text{cm}^{-1}$ , č. 2 na obr.) interferoval s DNA (deoxyribonukleová kyselina), ktorej maximálna intenzita bola nameraná pri  $792\ \text{cm}^{-1}$  (č. 1 na obr.). Pri bázach

nukleových kyselín dominujú valenčné vibrácie C-C väzieb nazývané ring breathing vibrations. Ich intenzita je merateľná v rozmedzí 600-800  $\text{cm}^{-1}$ , čo odpovedá nami identifikovanému píku pre DNA. Taktiež sú v Ramanovom spektre viditeľné aj symetrické valenčné vibrácie fosfodiesterovej väzby hlavného reťazca  $\nu(\text{PO}_2^-)$  pri 1 107  $\text{cm}^{-1}$  (č. 5 na obr.). Druhý pík dominantný pre PHB (1 457  $\text{cm}^{-1}$ , č. 9 na obr.) interferoval s lipidmi (1 427  $\text{cm}^{-1}$ , č. 8 na obr.). C-H vibrácie zvyšku  $\text{CH}_2$  väzby lipidov boli identifikované aj pri 1 304  $\text{cm}^{-1}$  (č. 7 na obr.). Prítomnosť tukov vo vzorke potvrdzuje aj výskyt trioleínu pri 1 062  $\text{cm}^{-1}$  (č. 4 na obr.). Esterová väzba medzi glycerolom a olejovými kyselinami v tomto triglyceride spôsobuje valenčné vibrácie  $\nu(\text{C=O})$ . Najväčšia intenzita bola pre trioleín nameraná u vzorky E. Bakteriálne bunky tejto vzorky boli kultivované s použitím substrátu glycerolu, čo pravdepodobne ovplyvnilo obsah tohto tuku vo vzorke. Výskyt proteínov vo vzorke bol dokázaný vďaka identifikácii L-fenylalanínu pri 1 007  $\text{cm}^{-1}$  (č. 3 na obr.). Pre túto aminokyselinu sú charakteristické valenčné vibrácie C-C väzieb jej benzénového kruhu označené ako trigonal ring breathing. Dôkazom výskytu proteínov je aj identifikácia píku amidu I pri 1 658  $\text{cm}^{-1}$  (vyznačený v spektre zelenou farbou, č. 10). Vibrácie symetrickej glykozidovej väzby  $\nu(\text{C-O-O})$  pri 1 132  $\text{cm}^{-1}$  (č. 6 na obr.) naznačujú prítomnosť sacharidov v bunkách. V Ramanovom spektre nameranom pre vzorku A bola identifikovaná D-xylóza pri 1 142  $\text{cm}^{-1}$  [39,40]. Tento monosacharid bol použitý ako substrát pre bakteriálne bunky tejto vzorky počas ich kultivácie.



Obr. 35 Namerané Ramanové spektrá všetkých vzoriek baktérií a vyznačené píky, ktoré boli identifikované

Tab. 9 Označenie vzoriek a prislúchajúce bakteriálne kmene

Označenie vzorky	Názov baktérie
<b>A</b>	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>
<b>B</b>	<i>Schlegelella aquatica</i>
<b>C</b>	<i>Thermomonas hydrothermalis</i>
<b>D</b>	<i>Tepidomas taiwanensis</i>
<b>E</b>	<i>Rubrobacter spartanus</i>
<b>F</b>	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>
<b>G</b>	Izolát 34

Tab. 10 Bunkové štruktúry/biochemické väzby identifikované v nameraných Ramanových spektrách bakteriálnych buniek s prislúchajúcimi vlnovými číslami

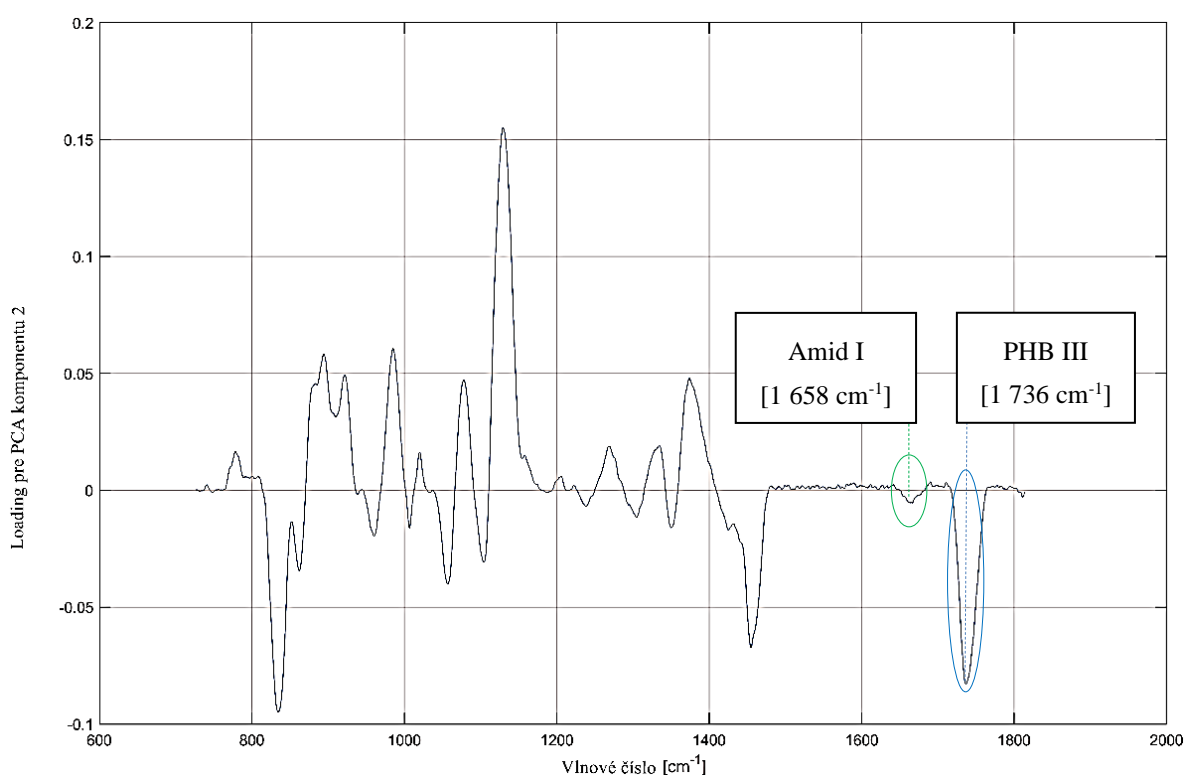
Označenie píku	Vlnové číslo [cm <sup>-1</sup> ]	Bunková štruktúra/biochemická väzba	Referencia
<b>1</b>	792	$\nu(\text{C-C})$ – fosfodiesterová väzba (DNA)	[39]
<b>2</b>	838	PHB I	[40]
<b>3</b>	1 007	$\nu(\text{C-C})$ – L-Fenylalanín (proteíny)	[39,41]
<b>4</b>	1 062	$\nu(\text{C=C})$ – esterová väzba (tuk trioleín)	[39]
<b>5</b>	1 107	$\nu(\text{PO}^{2-})$ – fosfodiesterová väzba (DNA)	[39]
<b>6</b>	1 132	$\nu(\text{C-O-O})$ – symetrická glykozidová väzba	[39]
<b>7</b>	1 304	$\nu(\text{C-H})$ – CH <sub>2</sub> väzba (lipidy)	[39]
<b>8</b>	1 427	$\nu(\text{C-H})$ – CH <sub>2</sub> väzba (lipidy)	[39]
<b>9</b>	1 457	PHB II	[40]
<b>10</b>	1 658	amid I (proteíny)	[39,41]
<b>11</b>	1 736	PHB III	[40]

PCA je štatistická metóda, ktorej princípom je vytvorenie menšieho množstva nových premenných z pôvodných a tým sa analýza väčšieho množstva výsledkov zjednoduší. V experimentálnej časti tejto práce bola táto metóda využitá na porovnanie toho ako sa namerané intenzity pri jednotlivých vlnových číslach menia v rámci rozdielnych vzoriek. Graf z PCA analýzy vzoriek, ktorý zobrazuje loading pre PCA komponentu 2 voči vlnovému číslu je uvedený na obr. 36. Z grafu je možné vidieť, že nameraná intenzita pri vlnovom čísle 1 658 cm<sup>-1</sup> sa v rámci rôznych vzoriek veľmi nemení (vyznačené na obr. zelenou farbou). Jednotlivé vzorky sa medzi sebou pravdepodobne veľmi neodlišovali v obsahu proteínov - amidu I a tento pík bol zvolený pre normalizáciu Ramanovho spektra. Modrou farbou je v grafe vyznačená veľmi sa meniacia medzi jednotlivými vzorkami nameraná intenzita pre pík PHB III.

Tab. 11 znázorňuje namerané údaje použité k vytvoreniu kalibračnej krivky uvedenej na obr. 37. Tento graf popisuje závislosť obsahu PHB v bunkách baktérií na relatívnej Ramanovej intenzite. Identifikácia bodov kalibračnej krivky je možná podľa farebného označenia vzoriek v tabuľke. Zostavená kalibračná krivka môže byť vhodná pre analýzu obsahu PHB v bunkách uvedených termofilných baktérií. Po dosadení relatívnej Ramanovej intenzity (namerané intenzity píkuv PHB III/amid I) do rovnice regresie  $I_{RR} = 0,13 \cdot \text{PHB} - 2,79$  s



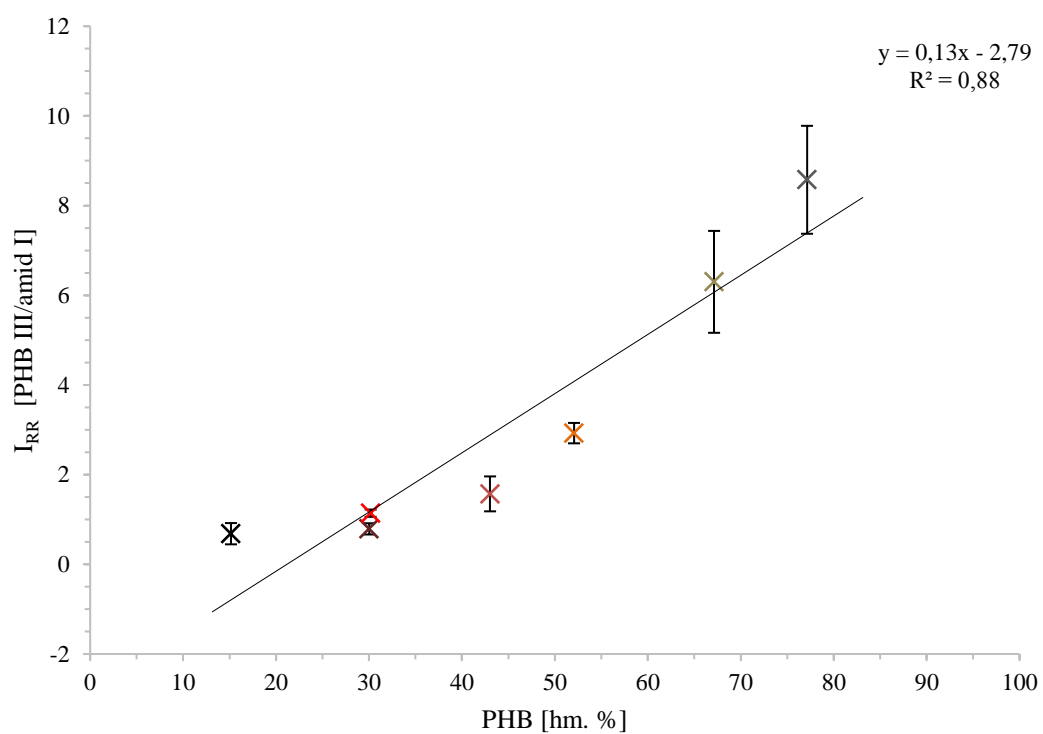
indexom korelácie  $R^2 = 0,88$  je možné vypočítať obsah PHB v bunkách baktérie. Chybové úsečky reprezentujú v oboch smeroch štandardnú odchýlku vypočítanú z pätnástich meraní uskutočnených pre každú vzorku. Keďže v kultúre sa bunky nenachádzajú v tom istom rastovom štádiu, tieto úsečky pravdepodobne znázorňujú odchýlku v rámci kultúry. Heterogenitu bakteriálnej kultúry spôsobuje aj to, že PHB sa vyskytujú vo forme granúl. Odchýlky však mohli vzniknúť aj pri meraní Ramanovho spektra, pretože kvapka vzorky bakteriálnych buniek mohla byť v rôznych miestach inak koncentrovaná. Pri vysušení kvapky vzorky dochádza ku kryštalizácii PHB a tento polymér sa nenachádza teda v amorfnom stave. Týmto procesom sa ovplyvní výsledné množstvo PHB vo vzorke bakteriálnej kultúry a teda aj namerané intenzity pre PHB-charakteristické píky. Výsledné hodnoty relatívnej Ramanovej intenzity a ich odchýlky pravdepodobne ovplyvnila aj nameraná intenzita píku pre amid I, ktorá bola použitá na normalizáciu Ramanovej intenzity nameranej pre PHB. Nameraná intenzita píku pre amide I je (aj keď veľmi málo) odlišná pre jednotlivé vzorky bakteriálnych buniek.



Obr. 36 Graf z PCA analýzy jednotlivých vzoriek – zobrazenie loadingu pre PCA komponentu 2 voči vlnovému číslu

Tab. 11 Namerané hodnoty relatívnej Ramanovej intenzity a koncentrácie PHB v bunkách

Označenie vzorky	PHB [hm. %]	I <sub>RR</sub> [PHB III/amid I]
F	15,15	0,68 ± 0,24
B	30,03	0,79 ± 0,13
C	30,18 ± 1,68	1,14 ± 0,08
E	43,03	1,57 ± 0,39
G	52,06 ± 0,64	2,93 ± 0,23
D	67,13 ± 0,01	6,30 ± 1,14
A	77,13 ± 6,39	8,58 ± 1,20



Obr. 37 Kalibračná závislosť obsahu PHB v bunkách baktérií na relatívnej Ramanovej intenzite



## 5 ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bola charakterizácia termofilných PHB produkujúcich baktérií. Na vizualizáciu baktérií a ich intracelulárnych bioplastov bola použitá kryo-SEM a pre vybraný bakteriálny kmeň aj TEM. Pred mikroskopovaním museli byť jednotlivé vzorky vhodne upravené. Na úpravu boli využité fyzikálne metódy úpravy.

Z fotografií realizovaných pomocou kryo-SEM bolo možné pozorovať u väčšiny PHB granúl plastickú deformáciu ihlicovitého tvaru. Deformácia je dôkazom zachovania vysokej flexibility aj pri nízkych teplotách a vzniká pri mrazovom lámaní vzorky. Vďaka vysokej flexibilitě môžu PHB granule ochrániť bakteriálne bunky pred šmykovým napätím počas mrazenia vzorky. U niektorých bakteriálnych kmeňov bolo na fotografiách zachytené aj delenie buniek (*Thermomonas hydrothermalis*), ale aj miesta po vypadnutí PHB granúl (*Rubrobacter spartanus*). Z porovnania kryo-SEM fotografií všetkých vzoriek vyplýva, že bunky izolátu 34 sú podstatne menšie a ako jediné majú prevažne sférický, a nie tyčinkovitý tvar. Z obrázkov baktérie *Schlegelella thermodepolymerans* bolo viditeľné, že najväčší obsah PHB akumuluje táto baktéria. Naopak baktéria *Rubrobacter xylanophilus* síce obsahuje veľké množstvo bakteriálnych buniek, ale množstvo PHB je v bunkách baktérií malé. Z výsledkov práce vyplýva, že pre dostatočnú vizualizáciu bakteriálnych buniek uvedených kmeňov by mala byť sublimácia vzoriek realizovaná pri  $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 7 minút v prístroji ACE600. Prípadne by mal byť čas tejto sublimácie optimalizovaný, aby nebola potrebná ďalšia sublimácia v mikroskope. Pri nadmernej sublimácii bol povrch kultivačného média vzoriek poškodený a vznikali artefakty. Avšak zvolením krátkeho času sublimácie vzoriek nebolo bakteriálne bunky na fotografiách dostatočne vidieť. Pokovovaním niektorých vzoriek baktérií platinou boli bunky na kryo-SEM fotografiách viditeľnejšie, pretože vrstva kovu spôsobila zvýraznenie bunkovej steny baktérií. Použitie platinového pokovovania na vzorky baktérií pred ich mikroskopovaním však vo všeobecnosti nezvýrazní PHB granule a sú rovnako viditeľné ako bez pokovovania. Aby sa predchádzalo nabíjaniu vzoriek a vzniku rozmazanej fotografie po okrajoch, bolo zistené, že použité zväčšenie pri fotografovaní pomocou mikroskopu a využití ETD detektora by malo byť maximálne 15– násobné. Pri nastavení immerzného módu a využití TLD detektoru však možno využiť aj väčšie zväčšenia a pozorovať väčšie detaily.

Na TEM fotografiách baktérie *Thermomonas hydrothermalis* boli viditeľné menšie PHB granule nachádzajúce sa v bunkách zväčša vo väčšom počte. Popis bakteriálnych buniek podľa TEM fotografií bol zhodný s popisom uvedeným v literatúre a aj z pozorovania kryo-SEM snímok.

Ďalším cieľom práce bola analýza chemického fingerprintu buniek pomocou Ramanovej spektroskopie. Z nasnímaných Ramanových spektier pre jednotlivé vzorky boli identifikované pri vlnových číslach známych z literatúry niektoré biomolekuly (DNA, proteíny, lipidy). Taktiež bola zostavená aj kalibračná krivka, ktorá môže byť vhodná pre analýzu obsahu PHB v bunkách uvedených termofilných baktérií. Táto kalibračná krivka udáva závislosť obsahu PHB v bunkách baktérií na relatívnej Ramanovej intenzite. Po dosadení relatívnej Ramanovej intenzity (namerané intenzity píkov PHB III/amid I) do rovnice regresie  $I_{RR} = 0,13 \cdot \text{PHB} - 2,79$  s indexom korelácie  $R^2 = 0,88$  je možné vypočítať obsah PHB

v bunkách baktérie. Pre zostavenie tejto kalibračnej krivky bol zvolený pík charakteristický pre PHB s maximom Ramanovej intenzity pri  $1\,736\text{ cm}^{-1}$ , pretože nedochádzalo k interferencii s inými biomolekulami. Ramanove spektrá boli normalizované k píku pre Amide I ( $1\,658\text{ cm}^{-1}$ ), pretože pomocou PCA bolo zistené, že pri tomto vlnovom čísle bola nameraná približne rovnaká intenzita v rámci všetkých vzoriek.

Referenčnou metódou kvantifikácie množstva PHB v bunkách baktérií bola k Ramanovej spektroskopii plynová chromatografia. Z nameraných hodnôt pomocou tejto analytickej metódy vyplýva, že vzorka s baktériou *Schlegelella thermodepolymerans* sa vyznačovala nielen najvyššou koncentráciou biomasy ( $3,54 \pm 0,02\text{ g/l}$ ), ale aj najvyšším obsahom PHA ( $77,13 \pm 6,39\text{ hm. \%}$ ). Najnižšia koncentrácia biomasy bola dosiahnutá u vzorky s baktériou *Rubrobacter xylanophilus* a to len  $0,23 \pm 0,01\text{ g/l}$ . Pri tejto vzorke bol nameraný aj najnižší obsah PHA (len  $15,15\text{ hm. \%}$ ). U vzorky s baktériou *Schlegelella thermodepolymerans* bola pomocou spektrofotometrického stanovenia pri  $635\text{ nm}$  zistená aj najvyššia optická hustota ( $12,47 \pm 0,60$ ). Najnižšia optická hustota ( $1,55 \pm 0,19$ ) bola spektrometrom nameraná u vzorky s baktériou *Schlegelella aquatica*.

Je zrejmé, že analýza PHB v bunkách baktérií pomocou Ramanovej spektroskopie je v porovnaní s plynovou chromatografiu rýchlejšia, menej náročná na prevedenie (potreba malého množstva vzorky) a šetrnejšia (nepoužívanie množstva rozpúšťadiel). Ďalšie experimenty by však mohli byť zamerané na uskutočnenie viacerých kultivácií jednotlivých bakteriálnych kmeňov s rôznym obsahom PHB v ich bunkách. Nasnímaním Ramanových spektier týchto vzoriek baktérií by boli zistené hodnoty Ramanovej intenzity pre vzorky s rôznym obsahom PHB v bakteriálnych bunkách. Mohla by byť zostavená presnejšia kalibračná krivka s rovnicou regresie, z ktorej by bolo možné vypočítať obsah PHB v bunkách konkrétneho kmeňa baktérie.

Z porovnania TEM a kryo-SEM fotografií vzoriek baktérií vyplýva, že vďaka lepšiemu rozlíšeniu boli bunky a PHB granule viditeľnejšie na TEM fotografiách. Pri použití tohto typu mikroskopie môžu byť bunky aj viac priblížené a pritom snímky budú dostatočne ostré. TEM poskytuje teda informácie o vnútorných detailoch vzorky lepšie. Kryo-SEM taktiež poskytlo snímky vnútra vzoriek (viditeľné PHB granule) vďaka využitiu mrazového lámania pred mikroskopovaním. S využitím takto upravenej SEM nie je teda možné získať informácie len z povrchu vzoriek. Výhodou pri kryo-SEM bolo aj neovplyvnenie bakteriálnych buniek chemickými činidlami, pretože boli použité fyzikálne metódy úprav vzoriek. Plasticke deformácie intracelulárnych PHB granúl však nebola viditeľná na TEM obrázkoch, iba na kryo-SEM, pretože pred fotografovaním neboli vzorky mrazovo lámané.

Práca dokazuje, že začlenenie spomenutých techník do procesu produkcie a kvantifikácie PHA môže byť výhodné pre výrobu týchto bioplastov. Všetky 3 metódy sú vhodné aj k identifikácii nových mikroorganizmov akumulujúcich PHA, čo zabezpečí produkciu rozmanitejšieho spektra týchto biodegradovateľných polymérov. PHA by mohli nahradiť konvenčné plasty vo väčšom rozsahu, ako je tomu doteraz, pretože predstavujú ekologickejší polymérny materiál.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1
- [2] DAVIDSON, Michael W. *Bacteria Cell Structure*. Molecular expressions [online]. The Florida State University, 2015 [cit. 2020-10-09]. Dostupné z: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>
- [3] PAHLOW, Susanne, Susann MEISEL, Dana CIALLA-MAY, Karina WEBER, Petra RÖSCH a Jürgen POPP. *Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy*. Advanced Drug Delivery Reviews [online]. 2015, 89, 105-120 [cit. 2020-10-07]. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.006. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000629>
- [4] BARTENEVA, Natasha S. a Ivan A. VOROBYEV. *Cellular Heterogeneity: Methods and Protocols* [online]. USA: Humana press, 2018 [cit. 2020-10-07]. ISBN ISBN 978-1-4939-7680-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7680-5>
- [5] SPRING, Kenneth R. a Michael W. DAVIDSON. *Introduction to Fluorescence Microscopy*. MicroscopyU [online]. Melville, New York, 2016 [cit. 2020-10-09]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- [6] HIBBS, Alan R. *Confocal Microscopy for Biologists*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004, ISBN 978-1-4757-0983-4.
- [7] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids*. Scientific Reports. 2016, 6(1). [cit. 2020-10-07]. DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep26612>
- [8] SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER, et al. *Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by Cupriavidus necator H16*. Sensors [online]. 2016, 16(11) [cit. 2020-10-07]. DOI: 10.3390/s16111808. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/11/1808>
- [9] KOLLER, Martin, Lukáš MARŠÁLEK, Miguel Miranda DE SOUSA DIAS a Gerhart BRAUNEGG. *Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner*. New Biotechnology. 2017, 37, 24-38 [cit. 2020-10-08]. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.001. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416300115>
- [10] ALDOR, Ilana S. a Jay D. KEASLING. *Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates*. Current Opinion in Biotechnology. 2003, 14(5), 475-483 [cit. 2020-10-08]. DOI: 10.1016/j.copbio.2003.09.002. ISSN 09581669.
- [11] LEE, Sang Yup. *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. Biotechnology and bioengineering. 1996, 49(1), 1-14 [cit. 2020-10-09]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P. Dostupné z: [https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P)

- [12] MACRAE, Roderick M. a James F. WILKINSON. *Poly-B-hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of Bacillus cereus and Bacillus megaterium*. In: J. gen. Microbiol. 19 [online]. Bareriology Department, University of Edinburgh, 1958, s. 210-222 [cit. 2020-10-08]. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/19/1/mic-19-1-210.pdf?expires=1540666049&id=id&accname=guest&checksum=DEB03FA5EC69F1C48BCB135F2D90E75D>
- [13] NUMATA, Keiji, Yoshihiro KIKKAWA, Takeharu TSUGE, Tadahisa IWATA, Yoshiharu DOI a Hideki ABE. *Enzymatic Degradation Processes of Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-(R)-3-hydroxyvaleric acid] Single Crystals Revealed by Atomic Force Microscopy: Effects of Molecular Weight and Second-Monomer Composition on Erosion Rates*. Biomacromolecules [online]. 2005, 6(4), 2008-2016 [cit. 2020-10-08]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0501151
- [14] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. *Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of Schlegelella thermodepolymerans from xylose rich substrates*. Bioresource Technology [online]. 2020, 315 [cit. 2020-10-10]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885
- [15] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. *Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria*. Current Opinion in Biotechnology [online]. 2018, 50, 94-100 [cit. 2020-10-08]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.11.016
- [16] ELBANNA, Khaled, Tina LÜTKE-EVERSLOH, Stefanie VAN TRAPPEN, Joris MERGAERT, Jean SWINGS a Alexander STEINBÜCHEL. *Schlegelella thermodepolymerans gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate)*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2003, 53(4), 1165-1168 [cit. 2020-10-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02562-0
- [17] CHOU, Yi-Ju, Shih-Yi SHEU, Der-Shyan SHEU, Jih-Terng WANG a Wen-Ming CHEN. *Schlegelella aquatica sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2006, 56(12), 2793-2797 [cit. 2020-10-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.64446-0
- [18] NORMAN, Jeffrey S., Gary M. KING a Maren L. FRIESEN. *Rubrobacter spartanus sp. nov., a moderately thermophilic oligotrophic bacterium isolated from volcanic soil*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2017, 67(9), 3597-3602 [cit. 2020-10-11]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.002175
- [19] CARRETO, L., E. MOORE, M. F. NOBRE, R. WAIT, P. W. RILEY, R. J. SHARP a M. S. DA COSTA. *Rubrobacter xylanophilus sp. nov., a New Thermophilic Species Isolated from a Thermally Polluted Effluent*. International Journal of Systematic Bacteriology [online]. 1996, 46(2), 460-465 [cit. 2020-10-11]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-46-2-460

- [20] CHEN, Tien-Lai, Yi-Ju CHOU, Wen-Ming CHEN, Bhagwath ARUN a Chiu-Chung YOUNG. *Tepidimonas taiwanensis* sp. nov., a novel alkaline-protease-producing bacterium isolated from a hot spring. *Extremophiles* [online]. 2006, 10(1), 35-40 [cit. 2020-10-11]. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-005-0469-9
- [21] ALVES, Marta P., Fred A. RAINEY, M. Fernanda NOBRE a Milton S. DA COSTA. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., A New Slightly Thermophilic  $\gamma$ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2003, 26(1), 70-75 [cit. 2020-10-11]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1078/072320203322337335
- [22] ZAPATA, Félix, Fernando ORTEGA-OJEDA, Carmen GARCÍA-RUIZ a Miguel GONZÁLEZ-HERRÁEZ. *Selective Monitoring of Oxyanion Mixtures by a Flow System with Raman Detection*. *Sensors* [online]. 2018, 18(7) [cit. 2020-10-11]. DOI: 10.3390/s18072196. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/7/2196>
- [23] PAHLOW, Susanne, Susann MEISEL, Dana CIALLA-MAY, Karina WEBER, Petra RÖSCH a Jürgen POPP. *Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy*. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2015, 89, 105-120 [cit. 2020-10-11]. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.006. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000629>
- [24] MCCREERY, Richard L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. USA: A JOHN WILEY & SONS, 2000. ISBN 0-471-25287-5.
- [25] KOPLÍK, Richard. *Infračervená a Ramanova spektroskopie* [online]. Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chémie a technológie v Prahe, 2014 [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplirk/7\\_FA\\_IR\\_Raman\\_2014.pdf](https://web.vscht.cz/~koplirk/7_FA_IR_Raman_2014.pdf)
- [26] CIOBOTĂ, Valerian, Eva-Maria BURKHARDT, Wilm SCHUMACHER, Petra RÖSCH, Kirsten KÜSEL a Jürgen POPP. *The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 397(7), 2929-2937 [cit. 2020-10-13]. DOI: 10.1007/s00216-010-3895-1. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3895-1>
- [27] *Raman Microscopy*. Biovendor [online] [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: <https://www.biovendor.com/raman-microscopy>
- [28] BOZZOLA, John J. a Lonnie Dee RUSSELL. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists* [online]. 2. Sudbury, Massachusetts: Johnes and Bartlett Publishers, 1992 [cit. 2020-10-20]. ISBN 9780763701925.
- [29] NEBESAROVA, Jana. *Elektronová mikroskopie pro biology*. Paru.cas [online]. České Budějovice, Czech Republic: Biology Centre CAS, 2001 [cit. 2020-11-19]. Dostupné z : <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/>.
- [30] EGERTON, R.F. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM* [online]. 2. Švajčiarsko: Springer International Publishing, 2016 [cit. 2020-10-22]. DOI 10.1007/978-3-319-39877-8. ISBN 978-3-319-39877-8.

- [31] ECHLIN, Patrick. *Low-Temperature Microscopy and Analysis* [online]. New York: Springer Science+Business Media, 1992 [cit. 2020-10-23]. DOI 10.1007/978-1-4899-2302-8. ISBN 978-1-4899-2302-8.
- [32] SRIAMORNSAK, Pornsak, Nartaya THIRAWONG, Kamonrak CHEEWATANAKORNKOOL, Kanokporn BURAPAPADH a Witoon SAE-NGOW. *Kryo-scanning electron microscopy (kryo-SEM) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate*. International Journal of Pharmaceutics [online]. 2008, 352(1-2), 115-122 [cit. 2020-10-23]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.038
- [33] CAVALIER, Annie, Danielle SPEHNER a Bruno M. HUMBEL. *Handbook of Kryo-Preparation Methods for Electron Microscopy*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. ISBN 978-0-8493-7227-8.
- [34] KARNOVSKY, Morris J. *A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy*. J. Cell Biol. [online]. 1965, 27:137-8A [cit. 2020-11-19].
- [35] BHATTACHARYA, Raktim, Sulagna SAHA, Olga KOSTINA, Lyudmila MURAVNIK a Adinpunya MITRA. *Replacing critical point drying with a low-cost chemical drying provides comparable surface image quality of glandular trichomes from leaves of Millingtonia hortensis L. f. in scanning electron micrograph*. Applied Microscopy [online]. 2020, 50(1) [cit. 2020-11-19]. ISSN 2287-4445. Dostupné z: doi:10.1186/s42649-020-00035-6
- [36] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Eva SLANINOVA, Ines FRITZ, Christina DAFFERT, Katharina MEIXNER, Zuzana SEDRLOVA a Martin KOLLER. *Novel unexpected functions of PHA granules*. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 2020, 104(11), 4795-4810 [cit. 2020-10-30]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10568-1
- [37] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Vladislav KRZYZANEK, et al. *Accumulation of Poly(3-hydroxybutyrate) Helps Bacterial Cells to Survive Freezing*. PLOS ONE [online]. 2016, 11(6) [cit. 2020-10-22]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157778
- [38] MATĚJKA, Filip. *Biotechnologická produkce PHA pomocí vybraných bakteriálních isolátů* [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/123992>. Bakalárska práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedúci práce Stanislav Obruča
- [39] DE GELDER, Joke, Kris DE GUSSEM, Peter VANDENABEELE a Luc MOENS. *Reference database of Raman spectra of biological molecules*. Journal of Raman Spectroscopy [online]. 2007, 38(9), 1133-1147 [cit. 2021-02-04]. ISSN 03770486. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.1734
- [40] DE GELDER, Joke, Diana WILLEMSE-ERIX, Maarten J. SCHOLTES, et al. *Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in Cupriavidus necator DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry [online]. 2008, 80(6), 2155-2160 [cit. 2021-02-11]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac702185d

[41] LIN-VIEN, Daimay, Norman B. COLTHUP, William G. FATELEY a Jeanette G. GRASSELLI. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules* [online]. 1. United Kingdom, London: Academic Press, 1991 [cit. 2021-02-26]. ISBN 0-12-451160-0. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780124511606/the-handbook-of-infrared-and-raman-characteristic-frequencies-of-organic-molecules>

## **7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK**

AFM – mikroskopia atomárných síl  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
ETD – Everhart-Thornley detektor  
FID – plameňovo-ionizačný detektor  
Kryo-SEM – kryogénna skenovacia elektrónová mikroskopia  
ISTD – interný štandard  
LTRS – Ramanova spektroskopia laserovej pinzety  
NB – Nutrient broth  
PCA – analýza hlavných komponent  
PCR – polymerázová reťazová reakcia  
PHA – polyhydroxyalkanoáty  
PHB – polyhydroxybutyrát  
RTG – röntgenové  
SEM – skenovacia elektrónová mikroskopia  
TEM – transmisná elektrónová mikroskopia  
TLD – through the lens detector  
TSB – Trypton soya broth



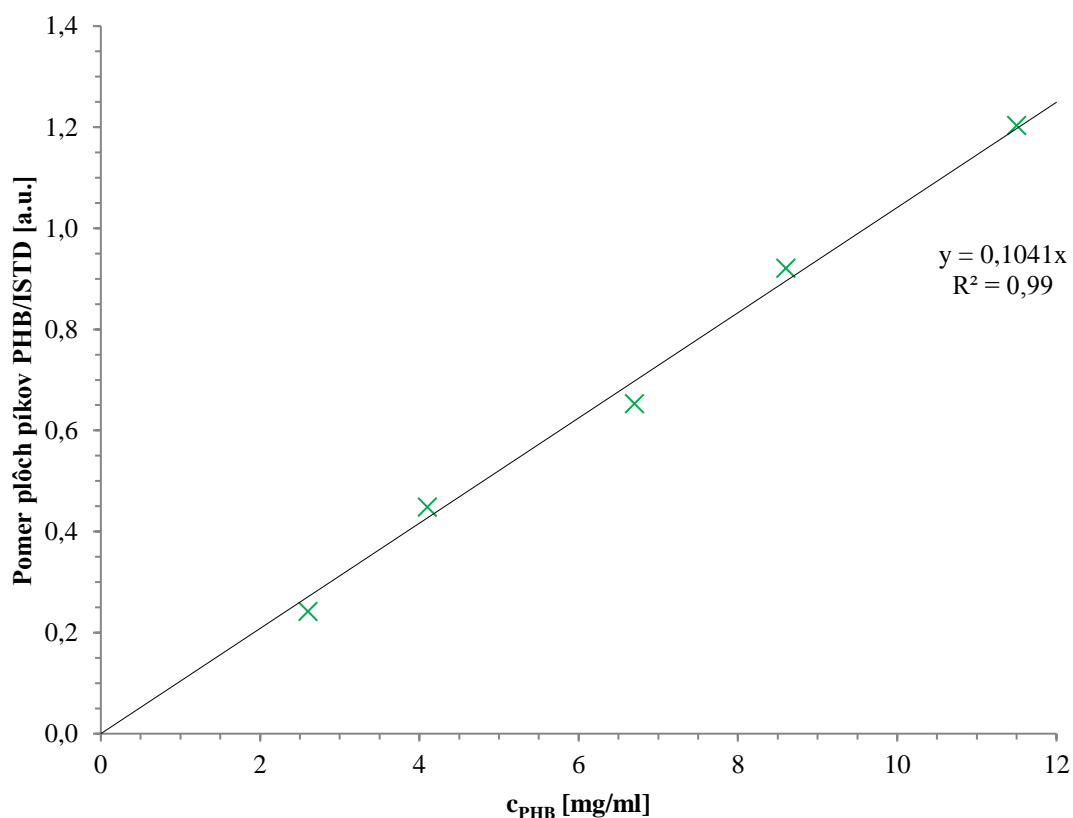
## 8 PRÍLOHY

### 8.1 Kalibrácia metódy pre stanovenie PHB pomocou plynovej chromatografie

Biomasa z jednotlivých vzoriek bola analyzovaná na plynovom chromatografe s FID detekciou na obsah PHA. Kalibračná závislosť koncentrácie PHB v biomase na pomere plôch píkov PHB k ISTD – kyseline benzoovej bola zostavená na základe analýzy štandardu PHB (postup vid' 3.4.1). Namerané hodnoty pomeru plôch píkov a prislúchajúce koncentrácie sú uvedené v tab. 12. Pre stanovenie obsahu PHB bola použitá rovnica regresie prislúchajúca kalibračnej krivke  $\text{PHB/ISTD} = 0,1041 \cdot c_{\text{PHB}}$  s indexom korelácie  $R^2 = 0,99$  (vid' obr. 38).

Tab. 12 Namerané hodnoty pomeru plôch píkov PHB/ISTD a prislúchajúce koncentrácie PHB

Pomer plôch píkov PHB/ISTD [a.u.]	$c_{\text{PHB}}$ [mg/ml]
0,24	2,60
0,45	4,10
0,65	6,70
0,92	8,60
1,20	11,50



Obr. 38 Kalibračná závislosť koncentrácie PHB v biomase na pomere plôch píkov PHB k ISTD